



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS
BACTERIANAS POR EL MÉTODO LAL EN LA SOLUCIÓN
ESTÉRIL DEXTROSA AL 5% EN SOLUCIÓN SALINA AL 0.9% DE
LA EMPRESA GINSBERG ECUADOR S.A”**

Trabajo de titulación presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: NÚÑEZ RODRÍGUEZ LEONARDO JAVIER

TUTORA: DRA. ELIZABETH ESCUDERO

Riobamba- Ecuador

2015

©**2015**, Leonardo Javier Núñez Rodríguez

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: “**VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS POR EL MÉTODO LAL EN LA SOLUCIÓN ESTÉRIL DEXTROSA AL 5% EN SOLUCIÓN SALINA AL 0.9% DE LA EMPRESA GINSBERG ECUADOR S.A.**”, de responsabilidad del señor Leonardo Javier Núñez Rodríguez, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación:

FIRMA

FECHA

Dra. Elizabeth Escudero

**DIRECTORA DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF. Fausto Contero

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

BQF. Cecilia Toaquiza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

Yo, Leonardo Javier Núñez Rodríguez soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

LEONARDO JAVIER NÚÑEZ RODRÍGUEZ

DEDICATORIA

A Dios por brindarme la vida cada día, a mi madre que estuvo incondicionalmente en todo momento y poder regalarle una alegría a su corazón, a mis familiares que siempre estuvieron dándome el apoyo necesario para culminar mis estudios.

Leonardo

AGRADECIMIENTO

A la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO por permitir desarrollarme en sus aulas y poder ser un profesional al servicio de la sociedad, a la EMPRESA GINSBERG ECUADOR S.A que me permitió desarrollar mi trabajo de titulación en sus instalaciones muchas gracias, a la Dra. Elizabeth Escudero quien me supo comprender y ayudar en el desarrollo del presente trabajo al igual que el BQF. Fausto Contero, a todos ellos gracias.

Leonardo

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xvi
--------------	-----

SUMMARY.....	xv
--------------	----

INTRODUCCION.....	1
-------------------	---

CAPITULO I

1.	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1	Empresa Ginsberg Ecuador S.A.....	5
1.1.1	Aseguramiento de Calidad	6
1.2	Validación	6
1.2.1	<i>Parámetros de una validación</i>	7
1.2.2	<i>Tipos de Validación</i>	10
1.2.3	<i>Elementos requeridos para la validación</i>	11
1.3	Importancia de determinar endotoxinas bacterianas en soluciones inyectables	13
1.4	Fundamento de la prueba LAL.....	14
1.5	Legislación de endotoxinas bacterianas	14
1.6	Endotoxinas Bacterianas	14
1.7	Prueba de la Endotoxina Bacteriana.....	16

1.7.1	<i>Tipos del método LAL</i>	17
1.7.2	<i>Mecanismo de acción</i>	18
1.7.3	<i>Ventajas de la prueba LAL</i>	19
1.7.4	<i>Interferencias de la técnica LAL</i>	20
1.8	Validación de la técnica LAL	21
1.9	Prospecto de la dextrosa al 5% en solución salina 0.9%	23

CAPITULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	24
2.1	Lugar de Realización	24
2.2	Materiales, equipos y reactivos	24
2.2.1	<i>Materiales de laboratorio</i>	24
2.2.2	<i>Equipos</i>	25
2.2.3	<i>Reactivos</i>	25
2.2.4	<i>Material de estudio</i>	26
2.3	Técnicas y métodos	26
2.3.1	<i>Método de gelificación</i>	26
2.3.2	<i>Determinación del tamaño muestral</i>	26
2.3.3	<i>Unidad de análisis o muestra</i>	27
2.3.4	<i>Especificaciones</i>	27

2.3.5	<i>Condiciones de trabajo</i>	27
2.3.6	<i>Preparación del vial de Control Estándar de Endotoxina (CSE)</i>	28
2.3.7	<i>Preparado del reactivo LAL</i>	28
2.3.8	<i>Preparación de la curva estándar</i>	28
2.3.9	<i>Calificación del operario</i>	30
2.3.10	<i>Confirmación de la sensibilidad del rotulo</i>	31
2.3.11	<i>Máxima Dilución Valida (MDV)</i>	32
2.3.12	<i>Ensayo Spike (Con adición de endotoxina)</i>	33
2.3.13	<i>Ensayo Unspike (Sin adición de endotoxina)</i>	35
2.3.14	<i>Determinación de Dilución de trabajo</i>	37
2.3.15	<i>Validación ensayo rutinario</i>	37
2.3.16	<i>Ensayo rutinario</i>	38
2.3.17	<i>Tratamiento estadístico de resultados</i>	39

CAPITULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	40
3.1	Resultados preliminares	40
3.2	Calificación del operario	40
3.3	Confirmación de sensibilidad del rótulo	41
3.4	Cálculo de la Máxima Dilución Valida (MDV)	42

3.5	Ensayos preliminares Spike y Unspike.....	44
3.5.1	<i>Resultados ensayo Spike (con adición de endotoxina)</i>	44
3.5.2	<i>Resultado ensayo Unspike (sin adición de endotoxina).....</i>	44
3.6	Determinación de la dilución de trabajo	45
3.7	Determinación de endotoxinas en la solución estéril Dextrosa al 5% en Solución Salina 0.9% en los sublotos	46
3.7.1	<i>Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas LOTE DEX001</i>	46
3.7.2	<i>Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas LOTE DEX002</i>	47
3.7.3	<i>Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas LOTE DEX003</i>	48
3.8	Prueba de rutina para la Dextrosa al 5% en Solución Salina 0.9%	49
3.8.1	<i>Resultados de la prueba de rutina</i>	49
3.8.2	<i>Resultados de la prueba de rutina</i>	49
3.8.3	<i>Resultados de la prueba de rutina.....</i>	50
	CONCLUSIONES.....	51
	RECOMENDACIONES.....	53
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Typical Analytical Characteristics Used in Method Validation.....	8
Tabla 2-1	Data Elements Required for Validation.....	12
Tabla 3-1	Parámetros requeridos USP 35.....	12
Tabla 1-3	Resultados de calificación del operario.....	40
Tabla 2-3	Media geométrica y desviación estándar calificación del operario.....	41
Tabla 3-3	Resultados Sensibilidad del rótulo.....	41
Tabla 4-3	Media geométrica y desviación estándar: sensibilidad del rótulo.....	42
Tabla 5-3	Resultados ensayo Spike (con adición de endotoxina).....	44
Tabla 6-3	Ensayo Unspike (sin adición de endotoxina).....	44
Tabla 7-3	Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas: LOTE: DEX001....	46
Tabla 8-3	Media geométrica y desviación estándar: LOTE: DEX001.....	46
Tabla 9-3	Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas: LOTE: DEX002....	47
Tabla 10-3	Media geométrica y desviación estándar: LOTE: DEX002.....	47
Tabla 11-3	Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas: LOTE: DEX003...	48
Tabla 12-3	Media geométrica y desviación estándar: LOTE: DEX003.....	48
Tabla 13-3	Resultados de la prueba de rutina LOTE: DEX001.....	49
Tabla 14-3	Resultados de la prueba de rutina LOTE: DEX002.....	49
Tabla 15-3	Resultados de la prueba de rutina LOTE: DEX003.....	50

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1-1	Estructura de las endotoxinas bacterianas.....	15
Figura 2-1	<i>Limululs polyphemus</i>	16
Figura 3-1	Reacción en cascada entre LAL y endotoxinas bacterianas.....	19
Figura 1-2	Curva estándar.....	30
Figura 2-2	Calificación del operario.....	31
Figura 3-2	Confirmación de la sensibilidad del rótulo.....	32
Figura 4-2	Spike (con adición de endotoxina).....	34
Figura 5-2	Unspike (sin adición de endotoxina).....	36
Figura 6-2	Validación ensayo rutinario.....	37
Figura 7-2	Ensayo rutinario.....	38

INDICE DE ANEXOS

Anexo A	Registro Sanitario Dextrosa al 5% en Solución Salina 0.9%
Anexo B	Limite de endotoxinas dextrosa al 5% en solución salina 0.9% USP 35
Anexo C	Endotoxinas bacterianas: capítulo 85 USP 35- NF 30
Anexo D	Fotografías: validación en el laboratorio

RESUMEN

Se realizó la validación de la determinación de endotoxinas bacterianas por el método LAL (Lisado de amebocitos *Limulus*) en la solución estéril Dextrosa al 5% en Solución Salina al 0.9%, la investigación se la desarrolló en la de la Empresa Ginsberg Ecuador S.A. ubicada en la ciudad de Quito, provincia de Pichincha. Para lo cual se tomaron tres muestras de cada lote piloto; las que fueron seleccionadas del inicio, medio y final de la producción por cada lote muestreado. Con cada una de las muestras piloto se procedió a realizar un bulk, para obtener tres sublotes para el análisis. Se confirmó la sensibilidad del reactivo LAL de 0.25 UE/mL y se calificó al analista para obtener resultados confiables. Se tomó de la Farmacopea de los Estados Unidos N° 35 el límite de endotoxinas para la Dextrosa al 5% en Solución Salina al 0.9% siendo este igual a 10 UE/g, la cual nos permitió a calcular la Máxima Dilución Valida (MVD) que fue igual a 2.36; se realizaron seguidamente los ensayos Spike y Unspike (preliminares) y no se detectó interferencia alguna en el producto farmacéutico, con lo que se determinó que la dilución de trabajo es de 1: 2.36. Se realizaron los ensayos de rutina los cuales permitieron determinar las endotoxinas bacterianas en cada sub lote previa mezcla, obteniéndose una media geométrica igual a 0.35 y una desviación estándar $0.18 < 0.365$, datos que se encuentran dentro de los límites descritos en la Farmacopea de los Estados Unidos N° 35. Se concluye que la determinación de endotoxinas bacterianas por el método del lisado de amebocitos queda validada para el Control de Calidad de la solución estéril Dextrosa al 5% en Solución Salina al 0.9%, se recomienda revalidar el método cada 6 meses para obtener resultados confiables en la determinación.

PALABRAS CLAVES: <VALIDACIÓN> <DETERMINACION DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS> <MÉTODO LAL [LISADO DE AMEBOCITOS *Limulus*]> <DEXTROSA AL 5% EN SOLUCIÓN SALINA 0.9%> <EMPRESA GINSBERG ECUADOR S.A.> <CONTROL DE CALIDAD> <DEPARTAMENTO DE FARMACIA>

SUMMARY

Limulus amoebocyte lysate (LAL) analysis was used to determine the endotoxin bacterial validation, in the sterile solution 5% Dextrose in a 0.9% saline solution. The development of the research was applied in Ginsberg Ecuador S.A. Company located in Quito- Pichincha. In which three samples from each pilot batch were taken; which were selected from the beginning, middle and the end of production for each lot. With each of the samples it was possible to carry out a bulk, to obtain three sublots which have to be analyzed. LAL reagent sensitivity of 0.25 UE/mL was confirmed, and the analyst was graded to get reliable results. The limit of endotoxin for dextrose 5% in saline solution 0.9%, being equal to 10 UE/g, was taken from the pharma-record of the United States No 35, which allowed calculating the Maximum Dilution Valid (MVD) that was equal to 2.36; sequentially, testing procedure Spike and Unspike (preliminary) were conducted, and no interference was detected in the pharmaceutical product, so it was determined that the working dilution is 1: 2.36. Routine tests were developed, which allowed determining the bacterial endotoxins in each subplot previous mixture, obtaining a geometric average equal to 0.35, and a standard deviation of $0.18 < 0.365$, this general data are within the limits described in the pharma-record of the United States No 35. It is concluded that Limulus amoebocyte lysate about the determination of endotoxin bacterial is a validated to Quality Control of the sterile solution 5% Dextrose in a 0.9% saline solution, it is recommended to apply this method every six months to obtain reliable results in the determination.

KEYWORDS: <VALIDATION> <DETERMINATION OF ENDOTOXIN BACTERIAL >
<LIMULUS AMEOCYTE LYSATE [LAL]> <5% DEXTROSE IN A 0.9% SALINE
SOLUTION> <GINSBERG-ECUADOR S.A. COMPANY> <QUALITY CONTROL> <
PHARMACY SERVICES DEPARTMENT>

INTRODUCCION

Identificación del problema

En la actualidad la industria farmacéutica elabora sus medicamentos con la utilización de procedimientos, operaciones y controles estrictos basados y descritos en las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) orientados a la calidad del medicamento, cumpliendo con las especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas que están legisladas por organismos internacionales y nacionales como las Farmacopeas oficiales, Administración de Alimentos y Drogas (FDA) y la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) en el Ecuador.

Por esto es necesario estandarizar y validar métodos confiables, rápidos y seguros que permitan garantizar la calidad del producto farmacéutico, con el fin de no deteriorar la salud del paciente, porque el objetivo primordial es mejorar su estado, y cuando no se cumplan con los parámetros de calidad establecidos evitar su comercialización para que no existan daños irreversibles en la población que posiblemente consuma dicho medicamento.

En una industria farmacéutica se produce una gran variedad de productos en distintas formas farmacéuticas destinados al uso humano, dentro de estas tenemos las de uso parenteral, las mismas que deben estar libres de microorganismos que deterioran la calidad de la solución inyectable.

El parámetro fundamental que debe ser analizado y que tiene una gran importancia en el control de calidad de las soluciones inyectables es la determinación de endotoxinas bacterianas, sustancias que son producidas por bacterias Gram negativas, causantes de ciertas complicaciones en especial fiebre cuando es administrado en el paciente.

Las endotoxinas bacterianas son los contaminantes más comunes en los productos farmacéuticos de uso parenteral humano y animal por lo que se debe cumplir con ciertos parámetros de calidad que se encuentran descritos en la United States Pharmacopeia (USP), en la que se encuentra especificado el límite permitido de endotoxinas para cada producto en dependencia de su principio activo.

Para el análisis se aplica el método LAL (*Limulus ameobocyte lysate*), prueba que se basa en la gelificación (formación de un coagulo firme) de las muestras analizadas cuando existe la presencia de endotoxinas, la prueba LAL reemplaza a la prueba en la que se usaba como animales de experimentación a conejos.

El principal problema que enfrenta una industria farmacéutica en los procesos de producción de soluciones estériles es la aparición de endotoxinas bacterianas que deben ser controladas, ya que es un requerimiento microbiológico exigido por las entidades reguladoras, por ello es importante validar la metodología necesaria para la determinación de endotoxinas bacterianas para la liberación del producto en línea y su futura comercialización.

Justificación de la investigación

La calidad en las soluciones inyectables son medidas a través de parámetros microbiológicos fundamentales: endotoxinas bacterianas y esterilidad, estas pruebas son realizadas con carácter obligatorio en el Laboratorio de Control de Calidad, Área de Microbiología, para cada producto, cada lote elaborado, desde su preparación (mezcla previa) y de los componentes que contiene el medicamento hasta la obtención del producto terminado después de realizar a la par su análisis fisicoquímico.

Es necesario realizar la determinación de endotoxinas bacterianas en los productos farmacéuticos parenterales debido a que estas son administradas directamente a circulación sanguínea, al ingresar estos contaminantes pueden inducir a muchas respuestas biológicas, debido a la reacción pirogénica manifestándose especialmente fiebre elevada.

La presente investigación es fundamental para la industria farmacéutica y hacia las personas que va destinada el producto farmacéutico ya que estamos relacionados directamente con el objetivo tres del Plan Nacional del Buen Vivir que es el de mejorar la calidad de vida de los ecuatorianos, la evidencia del cumplimiento de este objetivo es la documentación de la validación de la determinación de endotoxinas bacterianas para dar cumplimiento con las Buenas Prácticas de Manufactura, y control de calidad de la solución estéril para el uso humano.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Validar la determinación de endotoxinas bacterianas por el método LAL en la solución estéril Dextrosa al 5% en Solución Salina al 0.9% de la Empresa Ginsberg Ecuador S.A

Objetivos Específicos

- Comprobar la presencia de endotoxinas bacterianas a través del método LAL en la solución inyectable Dextrosa al 5% en Solución Salina al 0.9%.
- Calcular el valor de Máxima Dilución Valida para la solución inyectable “Dextrosa al 5% en Solución Salina al 0.9%.

- Confirmar la sensibilidad del rótulo del reactivo LAL 0.25 UE/mL y calificación del operario.
- Realizar los ensayos preliminares SPIKE y UNSPIKE para obtener la dilución de trabajo de la solución inyectable.
- Calcular la media geométrica y desviación estándar para el ensayo rutinario para la determinación de endotoxinas bacterianas para los bulk de los tres lotes pilotos de la dextrosa al 5% en solución salina 0.9%.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Empresa Ginsberg Ecuador S.A

Ginsberg Ecuador S.A es una empresa ubicada en la Provincia de Pichincha, cantón Quito en las calles Antonio Castillo N77 y Juan Barrezueta, presta servicios de manufactura de productos farmacéuticos para consumo humano en las diferentes formas farmacéuticas, las mismas que cumplen con las normativas técnicas y de salubridad que garantiza un producto de calidad.

Para satisfacer a los clientes y alcanzar su lealtad, contando con el personal motivado y capacitado siempre enfocado en la mejora continua, compromiso de la gerencia y el cumplimiento del sistema de gestión de la calidad (SGC) implementado con la norma ISO 9001:2008. (Ginsberg Ecuador S.A, 2014, p.2)

La visión contempla llegar a ser líder en la fabricación de medicamentos por medio de la innovación e implementación de nuevas y modernas tecnologías que marcan la diferencia a nivel internacional, su misión es elaborar productos farmacéuticos orientados a satisfacer las necesidades específicas del mercado, manteniendo estándares de calidad a nivel nacional e internacional. (Ginsberg Ecuador S.A, 2014, p.3)

1.1.1 Aseguramiento de Calidad

Este departamento consta de diferentes áreas que son: Control de Calidad, Validaciones, Documentación, las cuales permiten desarrollar, controlar parámetros y dar cumplimiento a las normas establecidas por los organismos reguladores, las especificaciones que se manejan en el Laboratorio Farmacéutico Ginsberg Ecuador S.A se basan en los descritos en la USP 35 y métodos que son validados por el Departamento de Validaciones. (Ginsberg Ecuador S.A, 2014, p.35)

1.2 Validación

La validación de un método analítico es un proceso de evaluación sistemático para demostrar que el método cumple con los requisitos necesarios para el uso al que está destinado, está constituida por varios parámetros que son: precisión, exactitud, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, robustez. (Salazar, 2004, <http://www.med.ufro.cl>)

“La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.” (USP 31–NF 26, 2008, p.733)

“La validación de métodos, es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado.” (FDA, 2000, <http://www1.paho.org/hq>)

La documentación que genera una validación se describe a continuación:

- Protocolo
- Informe
- Certificado
- Estado de validación
- Etiqueta de validación

En donde el protocolo se refiere a la metodología de análisis que se va a usar en la validación, el informe es la representación de resultados obtenidos plasmados en un escrito, el certificado se lo realizara después de haber analizado los datos obtenidos, y el estado de validación es un documento el cual estará a disposición del comité de calidad para su revisión total, la etiqueta de validación certifica que el proceso esta validado. (Ministerio de Salud Pública, 2013, <http://www.cecmec.med.cu>)

De acuerdo con la USP, la validación de un método analítico es el proceso por el cual el laboratorio establece que las características de funcionamiento del método cumplen con los requisitos para las que fueron establecidas, por lo que el objetivo principal del procedimiento de validación es garantizar que todos los resultados de los análisis sean confiables y seguros en el análisis de cada muestra. (Idrayanto, 2012, pp. 439-465)

1.2.1 Parámetros de una validación

Los siguientes parámetros están descritos en la Farmacopea de los Estados Unidos, los cuales vamos a definirlos en este apartado:

Tabla 1-1: Typical Analytical Characteristics

Accuracy
Precision
Specificity
Detection Limit
Quantitation Limit
Linearity
Range
Robustness

Fuente: USP 31-NF26, 2008, p.737

Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es cuan cercano son los resultados obtenidos por el procedimiento al valor verdadero, en el caso de una sustancia contenida en un fármaco, la exactitud puede ser determinada en un analito de pureza conocida o bien la comparación de los resultados obtenidos. (USP 35, 2012, p.733)

Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado en el que concuerdan los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica un procedimiento en varias ocasiones para diferentes muestras tomadas de una sola, la precisión de un método analítico es normalmente conocida como la desviación estándar relativa (coeficiente de correlación) o la desviación estándar de una serie de mediciones, esta puede ser medida en el grado de repetibilidad y reproducibilidad. (USP 35, 2012, p.733)

Especificidad

Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de componentes que pueden estar presentes tales como: impureza, productos de degradación, o de la matriz. (USP 35, 2012, p.734)

Límite de detección

Es una característica de pruebas de límite, es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado que a su vez no puede ser cuantificado en condiciones experimentales indicadas al inicio del estudio. (USP 35, 2012, p.734)

Límite de cuantificación

Es una característica de los ensayos cuantitativos para los niveles bajos de compuestos que contengan impurezas en medicamentos a granel y algunos productos terminados que sufren degradación, es la cantidad más baja de analito que en una muestra se puede identificar con precisión aceptable y condiciones establecidas para el experimento. (USP 35, 2012, p.735)

Linealidad y Rango

La linealidad es la capacidad que tiene el método analítico para producir resultados sean pruebas directas, transformaciones matemáticas, proporcional a la concentración de analito en muestras dentro de un rango. (USP 35, 2012, p.735)

Robustez

Es una medida de la capacidad de que el método analítico usado no sea afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método que están documentadas y proporcionan una idoneidad durante su uso. La robustez se la determina en el desarrollo del método analítico. (USP 35, 2012, p.736)

1.2.2 Tipos de Validación

Las validaciones están clasificadas de la siguiente manera de acuerdo al momento en las que se las realiza:

- **Concurrente:** es el que se realiza en un proceso común, el cual permite determinar si el método aplicado es adecuado y cumple con el propósito al que fue destinado, es usada para controlar tres lotes elaborados del producto. (Reyes, 2001, p.26)
- **Prospectiva:** este se la realiza cuando el producto a analizar es nuevo, lo cual involucra su desarrollo con toda su fase experimental, es aplicada cuando se trata de un proceso nuevo o cuando se haya efectuado cambios en su proceso de elaboración que afecten al producto. (Reyes, 2001, p.26)
- **Retrospectiva:** es aquel que establece evidencias documentadas de un método para analizar su idoneidad mediante los procesos de verificación y evaluación de datos acumulados, se la realiza para permitir darnos cuenta que si estamos dentro de los parámetros de especificación. (Reyes, 2001, p.27)

- **Revalidación:** se la realiza para determinar variaciones que afecten al producto, sean estas intencionales o erróneas teniendo así:
 - Revalidación periódica: es necesario debido a que en el proceso se pueden introducir variaciones propias del equipo que se usa.
 - Revalidación en caso de cambios: es aplicada cuando hay cambios en la formulación del producto. (Reyes, 2001, p.28)

1.2.3 Elementos requeridos para la validación

Los requisitos van desde determinaciones analíticas altamente exigentes, subjetivos de evaluación de atributos, debido a esto las pruebas requieren diferentes tipos de esquemas de validación, existen las siguientes categorías:

- **Categoría I:** Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de las sustancias medicamentosas a granel o principios activos en producto terminado.
- **Categoría II:** Procedimientos analíticos para determinar impurezas en sustancias a granel o compuestos de degradación en productos farmacéuticos acabados.
- **Categoría III:** procesos analíticos para la determinación de características de rendimiento.
- **Categoría IV:** pruebas de identificación. (USP 35, 2012, p.737)

Para cada una de estas categorías, se necesita información analítica diferente por lo que en la siguiente lista se encuentran los datos que son necesarios:

Tabla 2-1: Data Elements Required for Validation

Analytical Performance Characteristics	Category I	Category II		Category III	Category IV
		Quantitative	Limit Tests		
Accuracy	Yes	Yes	*	*	No
Precision	Yes	Yes	No	Yes	No
Specificity	Yes	Yes	Yes	*	Yes
Detection Limit	No	No	Yes	*	No
Quantitation Limit	No	Yes	No	*	No
Linearity	Yes	Yes	No	*	No
Range	Yes	Yes	*	*	No
* May be required, depending on the nature of the specific test.					

Fuente: USP 35-NF30, 2012, p.737

Tabla 3-1: Parámetros requeridos USP 31

Características de Desempeño analítico	Categoría I de valoración Prod.Termi. Graneles, conservante	Categoría II de valoración		Categoría III de valoración (características de desempeño, disolución)	Categoría IV de valoración (pruebas de identificación)
		Prueba de límite Cuantitativa (impurezas en fármacos)	Prueba de límite Cualitativa (metales pesados, etc.)		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza de la prueba específica

Fuente: USP 31-NF26, 2008, p.737

1.3 Importancia de determinar endotoxinas bacterianas en soluciones inyectables

Hoy en día la calidad, seguridad e inocuidad de los fármacos inyectables es de gran relevancia debido a su amplia producción y formulación en el tratamiento y prevención de las enfermedades, en la industrias se necesitan volúmenes inmensos de agua libre de pirógenos para la preparación de productos inyectables, el ambiente de los laboratorios, el personal, los implementos y equipos de trabajo, el agua y materias primas, presentan microorganismos que se desarrollan y afectan la calidad de los medicamentos de uso parenteral. (Carrillo et al., 2006, p.16)

Un contaminante presente de origen bacteriano en los medicamentos son las llamadas endotoxinas bacterianas que provienen de bacterias Gram negativas, estas endotoxinas producen en el organismo consecuencias que hasta pueden causar la muerte siendo un peligro para el hombre. (Carrillo et al., 2006, p.16)

Las farmacopeas exigen dentro de sus monografías oficiales la aplicación del método del lisado de amebocitos en los productos parenterales, para determinar endotoxinas bacterianas, que si son administradas en dependencia de la dosis son capaces de provocar una respuesta febril, shock y muerte en el paciente al que se le haya administrado. (Burguet et al., 2012, p.321)

El ensayo del LAL cumple con una de las alternativas en cuanto al principio ético sobre el uso de animales de experimentación, aplicado especialmente y de forma específica a vacunas sean estas para bacterias o virus, agentes antineoplásicos, radiofármacos y fármacos que estén diseñados para uso parenteral, así también puede ser usado en el control de calidad de alimentos y agua para inyectables. (Burguet y Brito, 2012, pp.32-33)

1.4 Fundamento de la prueba LAL

El método LAL se fundamenta en la coagulación de la hemolinfa que se produce por la interacción de la endotoxina con los amebocitos contenidos en el producto o muestra para analizar, lo que produce una liberación de una cascada de reacciones que permiten la formación de un coagulo de gel visible y consistente. (Burguet y Brito, 2012, p.33)

1.5 Legislación de endotoxinas bacterianas

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) establece la cuantificación de endotoxinas bacterianas por el método LAL como monitor de endotoxinas bacterianas para más del 90% de los productos parenterales que regula esta entidad, exigiendo que la cantidad de endotoxinas bacterianas sea inferior a los límites establecidos por la guía de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), por lo que es un requisito obligatorio para poder comercializar cualquier producto farmacéutico parenteral. (Burguet y Brito, 2012, p.33)

1.6 Endotoxinas Bacterianas

Las endotoxinas bacterianas son liposacaridos (LPS) que se encuentran en la membrana externa de Bacterias Gram negativas, estas constituyen un problema para la salud humana ya que al ser administrado producen principalmente estados febriles en los pacientes, algunas de las bacterias que lo producen son: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria* entre los principales. (Burguet et al., 2012, p.32)

Se denominan endotoxinas bacterianas porque están ligas a la bacteria y se liberan cuando la bacteria es destruida, algunas de las endotoxinas se liberan en la reproducción bacteriana, son estables a la temperatura, a dosis elevadas son toxicas, generalmente se liberan en forma de burbujas ligados fuertemente a LPS. (Osorio, 2011, p.61)

Hay que tomar en cuenta que cuando la concentración de endotoxinas bacterianas alcanza el umbral que puede tolerar el organismo que es de 5 EU/mL/kg de peso corporal puede producir efectos nocivos tales como: fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, náuseas, calambres, aumento de la proteína C (CRP) reactiva en suero. (Gonzáles, 2014, pp.4-6)

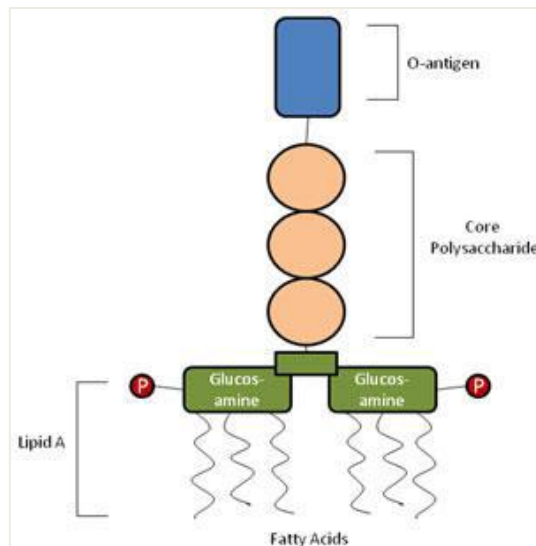


Figura N° 1-1. Estructura de las endotoxinas bacterianas

Fuente: Gonzáles, 2014, pp.4-6

1.7 Prueba de la Endotoxina Bacteriana

La historia del descubrimiento del método LAL empieza en 1956 cuando el doctor Frederick Bang hace un reporte sobre la muerte por coagulación intravascular en el *Limulus polyphemus* conocido como cangrejo herradura americano, por lo que se dice que desde la década de 1950, los científicos descubrieron que la sangre azul del *Limulus polyphemus* se coagulaba en presencia de las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella*. (Burguet y Brito, 2012, p.32)



Figura N° 2-1. *Limulus polyphemus*

Fuente: Dubczak, 2015, <http://www.genengnews.com>

Desde la USP 21-NF 15 existe una alternativa para esta prueba que se la realizaba en conejos, en este procedimiento in vitro se usa el extracto acuoso de los amebocitos circulantes del cangrejo en herradura *Limulus polyphemus*, conocido como Lisado de amebocitos del Limulus (LAL) este produce la formación de gel aglutinado si existe presencia de endotoxinas bacterianas por encima de una concentración límite, las muestra se las incubaba a 37°C.

Una ventaja de la prueba es que puede detectar la presencia de endotoxinas bacterianas en drogas que tienen efectos fisiológicos definidos y para los que no pudieron observarse en la prueba clásica del conejo. (Gennaro, 2003, p.639)

1.7.1 Tipos del método LAL

Existen 3 tipos del método LAL, método de gelificación (Gel-clot), turbidimétricos y cromogénicos. (Carrillo, 2006, p.68)

LAL, gelificación: este método se basa en que la enzima activada causa la gelificación de una proteína coagulable, cuando la concentración de endotoxinas es mayor a sensibilidad del reactivo LAL permite la formación de un gel, de acuerdo a esto se pueden hacer determinaciones cualitativas de endotoxinas. (González, 2014, pp.4-6)

LAL, turbidimétrico: la enzima activada inicia su gelificación en la prueba LAL por una proteína presente, posteriormente se mide la turbidez, antes que se forme el coagulo, es muy posible cuantificar la cantidad de endotoxina presente en la muestra de análisis. (González, 2014, pp.4-6)

LAL, cromogénico: la presencia de endotoxina activa la cascada enzimática, por lo que se pueden cuantificar las endotoxinas bacterianas en su punto final o en su cinética. (González, 2014, pp.4-6)

1.7.2 Mecanismo de acción

El mecanismo comprende una serie de pasos que conjuntamente con el LAL permiten la formación de gel en presencia de endotoxinas bacterianas.

1. La endotoxina bacteriana activa una proenzima de LAL.
2. La activación en ocasiones depende de la presencia de cationes metálicos como Ca, Mg o Mn.
3. La proenzima (tipo de proteasa), reaccionan con una proteína de bajo peso molecular, presente en el LAL.
4. La fracción de bajo peso molecular (caogulígeno), produce unidades y subunidades solubles e insolubles, la cual reacciona con la unidad insoluble apareciendo un coagulo sólido y firme de acuerdo a la cantidad de endotoxina presente en la muestra. (Cortés et al., 2006, pp.4-6)

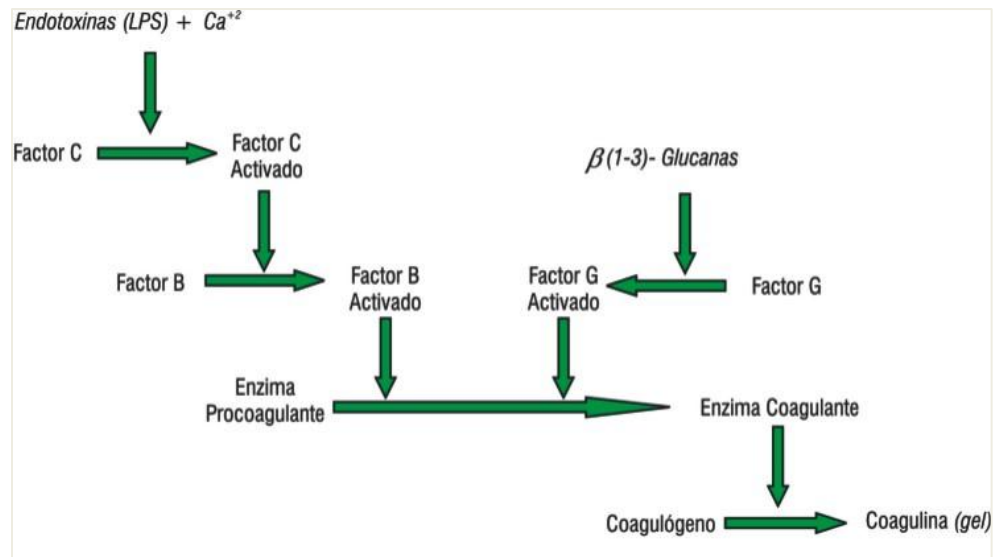


Figura N° 3-1. Reacción en cascada entre LAL y endotoxinas bacterianas

Fuente: Perdomo, 2004, p.38

1.7.3 Ventajas de la prueba LAL

La prueba LAL ofrece varias ventajas sobre la prueba biológica en conejos utilizada anteriormente para la detección de endotoxinas bacterianas en productos inyectables parenterales. Entre las cuales tenemos:

- Mayor Sensibilidad
- Puntual
- Mejor especificidad
- Menor variación
- Rápida
- Resultados cuantitativos
- Menor costo (Cortés et al., 2006, pp.4-6)

1.7.4 Interferencias de la técnica LAL

El reactivo LAL y su reacción esta interferida por lo general por 3 tipos de factores:

1. Inhibición

Se produce una disminución de la sensibilidad del LAL debido a:

- **pH:** solo se aceptan los que estén entre el rango 6-8.
- **Cationes divalentes:** neutralizan la carga negativa de las endotoxinas por lo que esto disminuye considerablemente la actividad.
- **Excipientes:** varios excipientes producen inhibición en la acción de prueba.
- **Agentes quelantes:** los más conocidos como Heparina, EDTA, que son capaces de enlazar cationes divalentes.
- **Material de vidrio:** no debe existir restos de NaOH que son capaces de no permitir la formación del coagulo. (Cortés et al., 2006, pp.4-6)

2. Potenciación

Incremento de sensibilidad del LAL, se la verifica cuando existe una mayor cantidad de endotoxinas previa su cuantificación, una forma más sencilla es colocar una cantidad de CSE a una muestra libre de endotoxinas y determinarlo con el ensayo de LAL. (Cortés et al., 2006, pp.4-6)

3. Falsos Positivos

Hay sustancias capaces de producir falsos positivos (tripsina, glicano) que activan a los componentes del LAL y se tiene un resultado positivo, por lo que es necesario conocer el proceso de elaboración del producto farmacéutico en este caso. (Cortés et al., 2006, pp.4-6)

1.8 Validación de la técnica LAL

Consta de varios parámetros entre estos tenemos:

1. Estándares de endotoxinas para la Prueba LAL

La USP y FDA realizaron una preparación de endotoxina de *Escherichia coli* llamado endotoxina estándar de referencia (RSE), lo cual nos sirve como estándar para calibrar la potencia de un CSE.

2. Validación del operario

Cuando el operario es nuevo o va a realizar la prueba LAL es necesario que se valide para que se obtengan valores confiables en la prueba.

Para lo cual se realiza de la siguiente manera, se preparan diluciones de CSE conocidas de 2λ , λ , $\lambda/2$, $\lambda/4$, se realizan cuatro replicas para lo cual la USP y la FDA dicen que la desviación estándar para un límite de 99% es igual a 0.365, si los resultados son inferiores a este valor están bajo control. (Cortés et al., 2006, pp.15-20)

3. Validación de la sensibilidad del rotulo

En esta prueba se verifica el rotulo que vamos a usar es decir verificamos si el reactivo LAL que vayamos a usar no tenga ningún cambio en la sensibilidad del rotulo, se realiza una prueba con 4 réplicas y concentraciones conocidas de 2λ , λ , $\lambda/2$, $\lambda/4$, determinando la media geométrica y la desviación estándar, esto se lo realiza para cada nuevo rotulo. (Cortés et al., 2006, pp.15-20)

4. Límites de endotoxina

Para los medicamentos parenterales el límite de endotoxina se define sobre la dosis, es igual a K/M , donde K es el umbral de dosis de endotoxina bacteriana humana por kg de peso corporal, y M es la dosis máxima recomendada de producto por kg de peso corporal en un periodo de horas. (USP 35, 2012, p.93)

5. Máxima de dilución válida

La fórmula que se usa para calcular la MVD está dada en la USP por lo que es la siguiente:

$$MVD = \frac{(\text{Limite de endotoxina} \times \text{concentración de la solución de muestra})}{\lambda}$$

Dónde:

- **Límite de endotoxina** = está dado por la USP en sus monografías
- **Concentración de la solución de muestra** = es la que se encuentra presente en el producto farmacéutico.
- λ = Sensibilidad del rotulo (USP 35, 2012, p.93)

6. Ensayos preliminares del producto

Después de haber calculado el MVD se realizan las diluciones correspondientes para demostrar si hasta la dilución calculada se puede detectar endotoxinas o exista alguna inhibición en el proceso. A estos procesos se le conoce como Spike y Unspike.

7. Ensayo validación del producto

Se la realiza para completar el proceso de validación después de haber ya hecho los cálculos correspondientes y se evalúa si el método detecta la presencia de endotoxinas bacterianas, estará más detallado en el capítulo de resultados.

1.9 Prospecto de la dextrosa al 5% en solución salina 0.9%

DEXTROSA AL 5% EN SOLUCION SALINA 0.9%

Composición: Cada 100 mL de solución inyectable contiene:

Principio Activo:

- | | |
|--------------------|-------|
| - D-glucosa | 5.0 g |
| - Cloruro de Sodio | 0.9 g |

Acción Terapéutica: Aporte hidroelectrolítico e hidrocalórico.

Dosis: según prescripción médica.

Presentación: soluciones inyectables envasadas en Funda plástica (PVC) transparente para sueros Tipo VI de 500mL

Vía de administración: Intravenosa (i.v)

Indicaciones: Está indicada en la restitución, mantenimiento de volumen circulante, en pacientes con patologías que requieren de aporte electrolítico y calórico. Las principales son: hemorragia quirúrgica, traumática, edema periférico o pulmonar, insuficiencia renal, deshidratación, vomito, hiperhidrosis, insuficiente ingestión de líquidos.

Contraindicaciones y advertencias: en pacientes diabéticos debe administrarse bajos estricto control médico, así también en pacientes con falla cardiaca congestiva, edema periférico o pulmonar, insuficiencia renal, hipertensión y toxemia gravídica. (Ginsberg Ecuador S.A, 2015, p.68)

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Realización

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Control de Calidad de la Empresa Ginsberg Ecuador S.A ubicada en las calles Antonio Castillo N77 y Juan Barrezueta de la ciudad de Quito, Provincia de Pichincha.

2.2 Materiales, equipos y reactivos

2.2.1 Materiales de laboratorio

- Puntas apirógenas para pipetas semiautomáticas
- Pipetas graduadas de 5 mL
- Frascos de vidrio
- Tubos para pruebas de endotoxinas
- Gradilla
- Tiras indicadoras de pH

NOTA: Todos los materiales de vidrio que fueron usados para la prueba fueron despirogenados por calor seco a 250 °C a 30 minutos, como se describe en la USP 35.

2.2.2 Equipos

- Agitador mecánico Vortex, Ilab-166 Calibrado (12 de Enero de 2015)
- Baño María, marca Selecta, Ilab-123 Calibrado (12 de Enero de 2015)
- Cronometro Ilab-154
- Cámara de flujo laminar marca Atmostech, Ilab-071 Calificación (Enero 2015)
- Horno de despirogenación marca, Ilab-158 Calibrado (14 de Enero de 2015)
- pH metro, marca Metler Toledo, Ilab-089 Calibrado (Enero 2015)

2.2.3 Reactivos

Para el estudio se usaron los siguientes reactivos:

- Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ENDOSAFE ®
Sensibilidad: 0.25 EU/mL
Lote: R1102500
Fecha de expiración: Marzo-2017
- Control Estándar Endotoxin (*Escherichia coli*) (CSE) ENDOSAFE ®
Concentración: 1000 UE/mL
Lote: EM21152
Fecha de Expiración: Marzo-2017
- LAL Reagent Water (LWR): Agua libre de pirógenos ENDOSAFE ®
Lote: 99732276
Fecha de expiración: Marzo-2017

2.2.4 *Material de estudio*

- Dextrosa al 5 % en Solución Salina 0.9 % de 500 mL
 - Piloto 1 Lote: DEX001
 - Piloto 2 Lote: DEX002
 - Piloto 3 Lote: DEX003

2.3 *Técnicas y métodos*

2.3.1 *Método de gelificación*

Se tomó de la USP 35 el método de gel en tubo para desarrollar el presente trabajo, este método permite establecer la presencia de endotoxinas como ensayo límite o como determinación semicuantitativa; el punto final se da con la formación de un gel firme.

La determinación del punto final de la reacción se la comparo con un Control Estándar de Endotoxina y las unidades se expresan así UE/mL; el pH de la muestra y el reactivo LAL debe estar comprendido entre 6.0 a 8.0, caso contrario se tendrá que realizar un ajuste de pH con NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N o soluciones reguladoras apropiadas estériles y libres de endotoxinas (apirógenas).

2.3.2 *Determinación del tamaño muestral*

El tamaño de la muestra corresponde a un total de 9 soluciones inyectables 3 de cada lote piloto en sus distintas etapas en su proceso de elaboración, escogidas al azar del inicio, medio y final de la producción del producto, para el análisis se realizó un bulk de cada lote para que los resultados sean confiables, la metodología usada fue la sugerida por la USP 35.

2.3.3 Unidad de análisis o muestra

La población que usamos en el estudio fue la solución estéril “Dextrosa al 5% en Solución Salina 0.9%” envasada en Funda plástica (PVC) transparente para sueros Tipo VI de 500mL producida en Ginsberg Ecuador S.A.

Las muestras fueron la composición de la solución estéril que por cada 100 mL contiene:

Principio Activo:

- D-glucosa 5.0 g
- Cloruro de Sodio 0.9 g

2.3.4 Especificaciones

El resultado debe ser mayor o igual a 0.5λ y menor o igual a 2λ , según los requerimientos de las farmacopeas oficiales. ($\geq 0.5 \lambda \leq 2 \lambda$) y la desviación estándar con un límite del 99% que quiere decir que debe ser < 0.365 .

La prueba es considerada valida cuando la menor concentración de la solución estándar de endotoxina, muestran resultados negativos en todas sus réplicas.

2.3.5 Condiciones de trabajo

Las muestras fueron preparadas dentro de una cabina de flujo vertical marca Atmostech, Ilab-071, la calificación de la cabina fue ejecutada en Enero del 2015, cuyas superficies internas fueron previamente desinfectadas con alcohol al 70%.

Todos los materiales de vidrio que fueron usados para la prueba fueron despirogenados por calor seco a 250 °C por 30 minutos, como se describe en la USP 35.

Incubación de las muestras 60 ± 2 minutos a 37° C.

2.3.6 Preparación del vial de Control Estándar de Endotoxina (CSE)

Se procedió a abrir el frasco Control Estándar de Endotoxina y se reconstituyó con 5 mL de Agua de Reactivo LAL. Durante un minuto se mezcló en el Vortex, y luego se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.

2.3.7 Preparado del reactivo LAL

Se reconstituyó el vial del reactivo con 5,2 mL de Agua de reactivo LAL, se mezcló el reactivo de manera que se formó una solución homogénea sin agitar bruscamente, se dejó reposar hasta que se obtuvo un color transparente.

2.3.8 Preparación de la curva estándar

Se preparó la curva estándar para usar en los ensayos rutinarios una concentración de 0.5 UE/mL, para lo cual se sigue el siguiente esquema:

Partiendo de la concentración inicial del vial del Control Estándar de Endotoxina que es igual a 1000 UE/mL, llegamos a una concentración de 0.5 UE/mL.

Se usó la fórmula

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Se realizó el cálculo para tener una concentración = 100 UE/mL

$$100 \text{ UE (2000}\mu\text{L)}=1000 \text{ UE (V}_2\text{)}$$

$$200 \mu\text{L} = V_2$$

$$200 \mu\text{L CSE} + 1800 \mu\text{L H}_2\text{O (T1)}$$

Se realizó el cálculo para tener una concentración = 10 UE/mL

$$200 \mu\text{L CSE (T1)}+ 1800 \mu\text{L H}_2\text{O (T2)}$$

Se realizó el cálculo para tener una concentración = 1 UE/mL

$$200 \mu\text{L CSE (T2)}+ 1800 \mu\text{L H}_2\text{O (T3)}$$

Se realizó el cálculo para tener una concentración = 0.5 UE/mL

$$1000 \mu\text{L CSE (T3)}+ 1000 \mu\text{L H}_2\text{O (T4)}$$

Curva estándar

$$C_1V_1=C_2V_2$$

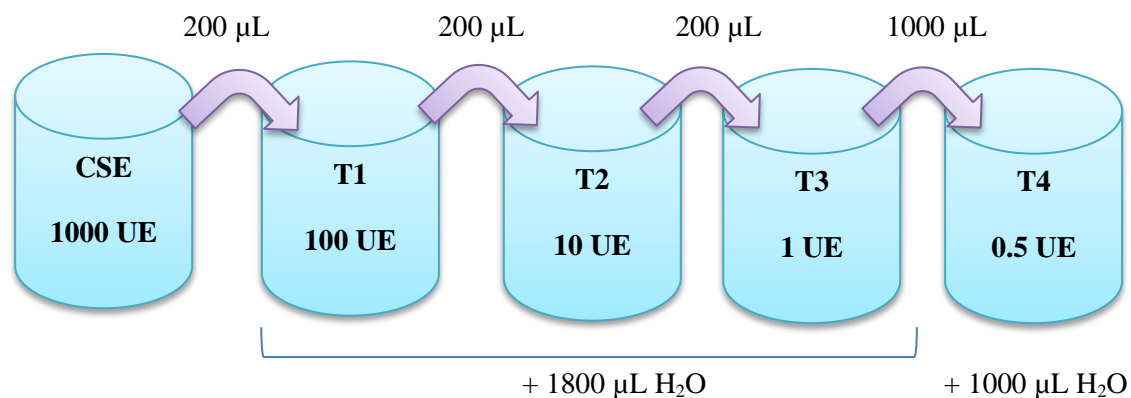


Figura N° 1-2. Curva estándar

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

2.3.9 Calificación del operario

Al igual que la confirmación de la sensibilidad del rotulo se realizan varias diluciones a varias concentraciones 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 a partir de 10 UE/mL del CSE, se adiciono el reactivo LAL, y se realizó el análisis por cuádruplicado para cada dilución, se coloca a baño María a una temperatura de 37° C, se realizó la lectura después de una hora, se calculó la media geométrica y la desviación estándar. El resultado es positivo cuando hay presencia de un gel que se mantiene firme cuando el tubo es puesto a 180°, el resultado es negativo cuando no existe presencia de gel en el tubo con la muestra.

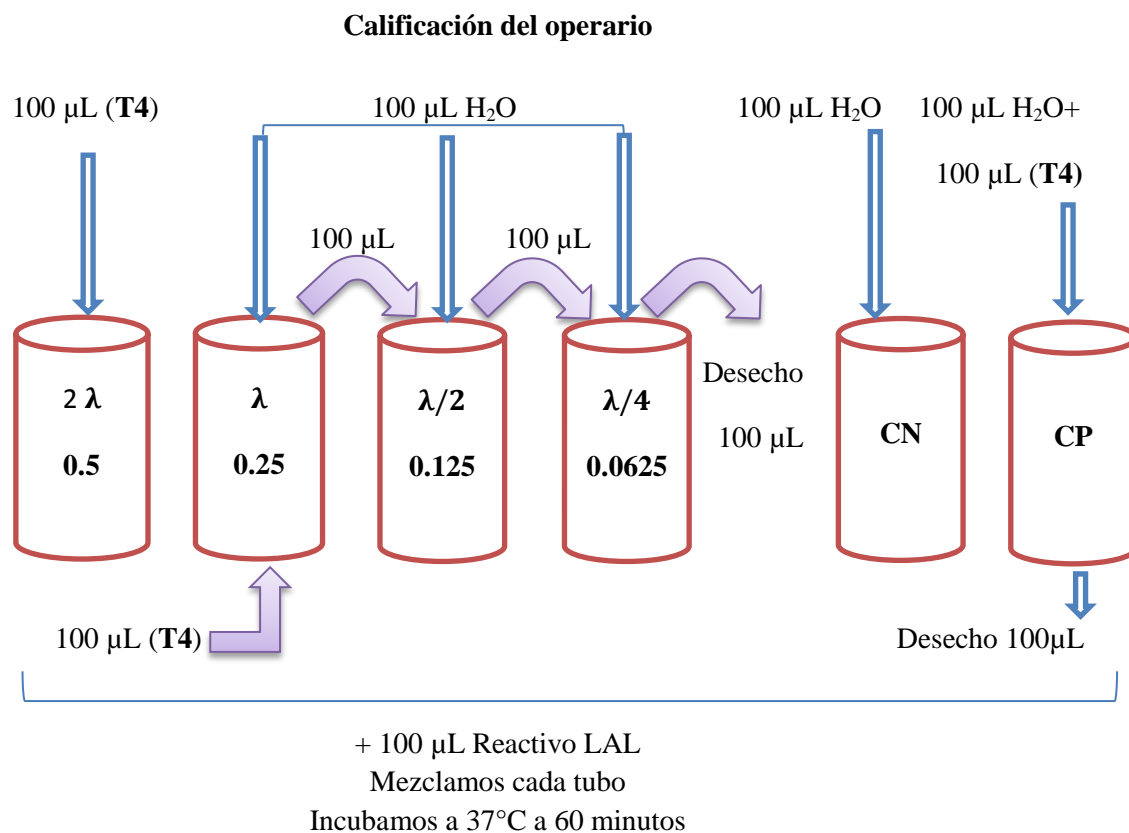


Figura N° 2-2. Calificación del operario

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

2.3.10 Confirmación de la sensibilidad del rotulo

Se realizó la confirmación de la sensibilidad del rotulo, usando 4 tubos despirogenados con concentraciones conocidas 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 en cada tubo se procedió a colocar 100 μL de T4 realizado en la curva estándar, al tubo 2, 3 y 4 se colocaron 100 μL de H₂O despirogenada LAL, en el tubo 4 después de realizar la mezcla se desechan 100 μL , seguidamente se añadió a todos los tubos 100 μL del reactivo LAL, se agita en Vortex y se coloca a 37° C por una hora. Se realizó la lectura invirtiendo los tubos a 180°, con estos datos se obtuvieron la media geométrica y desviación estándar en este caso.

Confirmación de la sensibilidad del rótulo

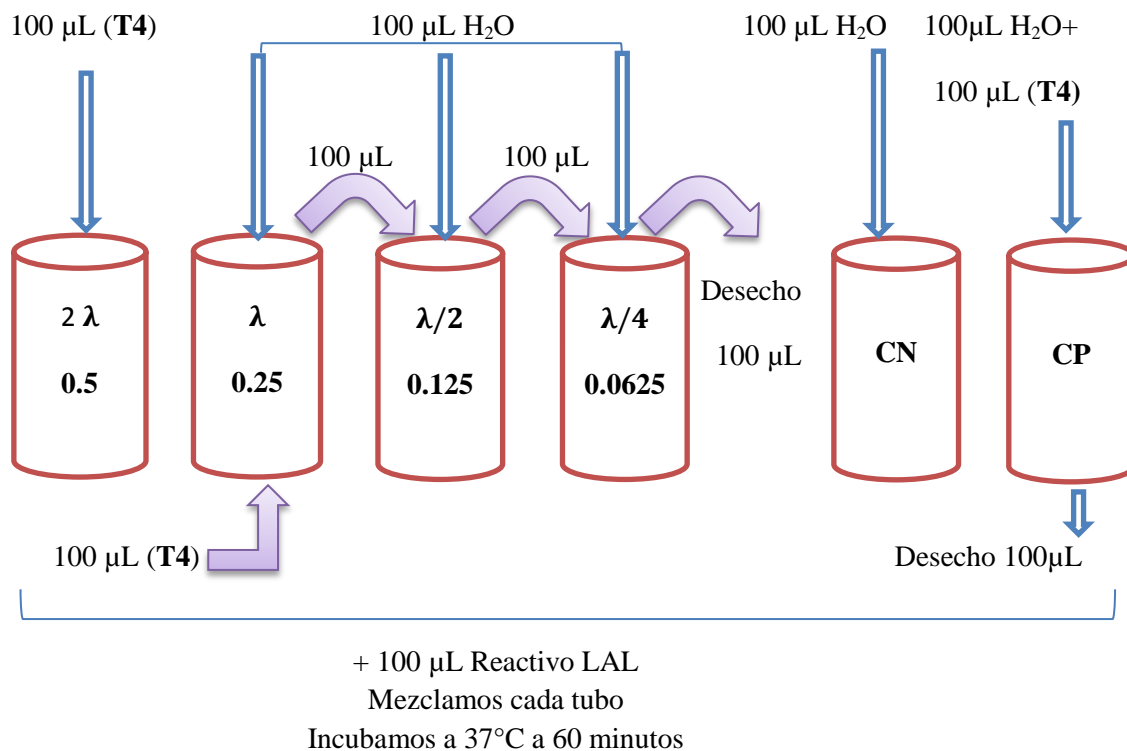


Figura N° 3-2. Confirmación de la sensibilidad del rótulo

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

2.3.11 Máxima Dilución Valida (MDV)

Para calcular la máxima dilución valida de la solución estéril Dextrosa al 5% en Solución Salina se aplicó la siguiente formula tomada de la USP 35.

$$MVD = \frac{(\text{Limite de endotoxina} \times \text{concentración de la solución de muestra})}{\lambda}$$

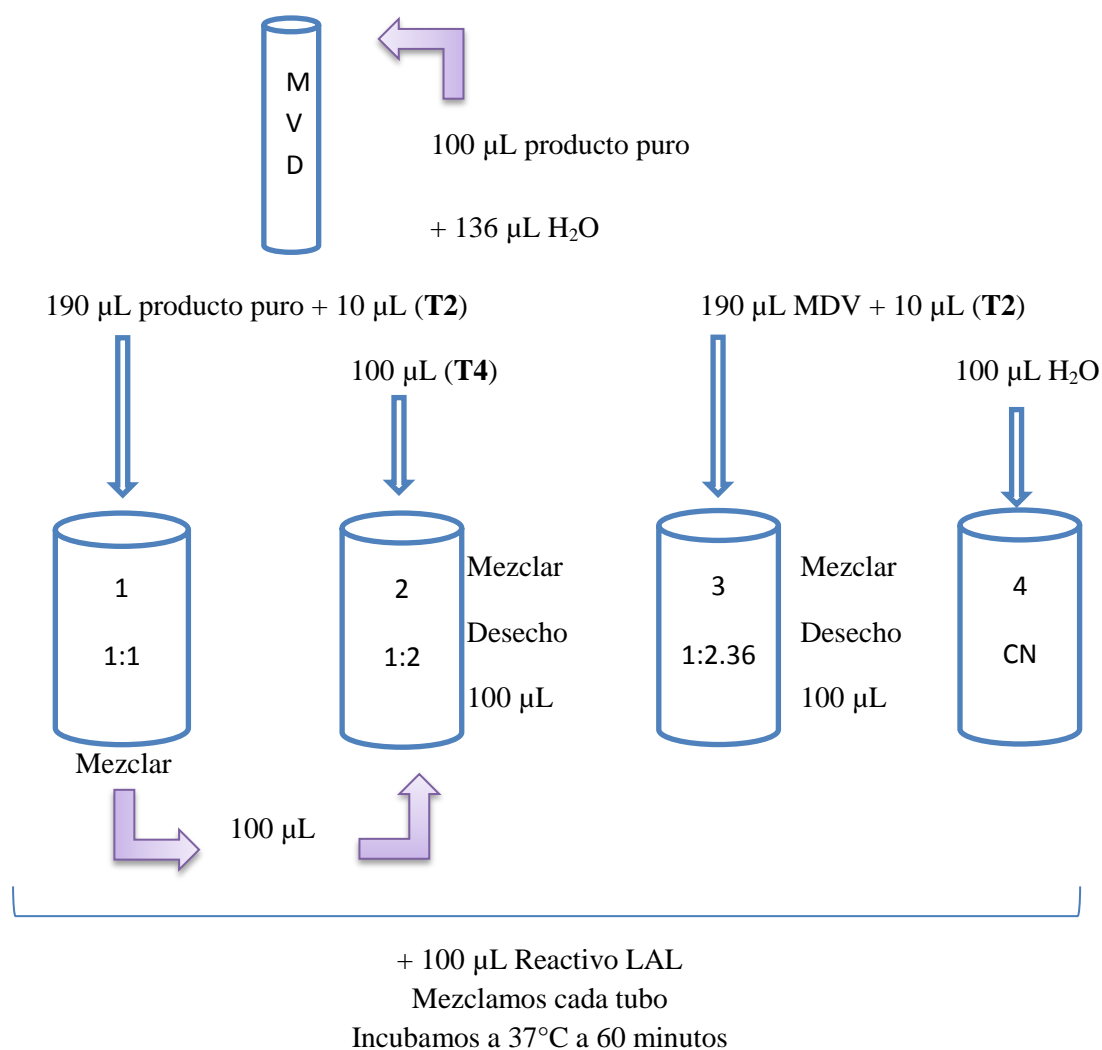
Dónde:

- **Límite de endotoxina** = está dado por la USP en sus monografías
- **Concentración de la solución de muestra** = es la que se encuentra presente en el producto farmacéutico.
- λ = Sensibilidad del rotulo

2.3.12 Ensayo Spike (Con adición de endotoxina)

- Se codifica los tubos con el número de la disolución desde el número 1 al 4.
- En el tubo 1 colocar 190 μ L de solución estéril (producto puro) con 10 μ L de endotoxina de concentración 10 UE/mL (**T2**), mezclar.
- Del tubo 1 se recoge 100 μ L y se agrega al tubo 2.
- En el tubo 2 añadimos 100 μ L de endotoxina 0.5 UE/mL (**T4**), mezclamos y desechamos 100 μ L.
- En un tubo 3, colocar 190 μ L de la máxima dilución valida (MVD) más 10 μ L de endotoxina de concentración 10 UE/mL (**T2**), mezclamos y desechamos 100 μ L.
- El control negativo se lo codifica con el número 4, el que solamente contiene 100 μ L de agua despirogenada, cuidadosamente añadimos 100 μ L del reactivo LAL a los 4 tubos incluido el control negativo.
- Agitar en el Vortex e incubar a una hora a una temperatura de 37°C, observar los resultados invirtiendo los tubos a 180°.

Ensayo Spike (con adición de endotoxina)



10 UE/mL: **T2**

0.5 UE/mL: **T4**

Figura N° 4-2. Ensayo Spike (con adición de endotoxina)

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

2.3.13 Ensayo Unspike (Sin adición de endotoxina)

Se realizó el siguiente procedimiento:

- Se codifica los tubos con el número de la disolución desde el número 1 al 4.
- En el tubo 1 colocar 200 µL de la solución estéril (producto puro).
- Se toma del tubo uno 100 µL se lo coloca en el tubo 2, añadimos 100 µL de agua, mezclamos y desechamos 100 µL.
- En un tubo sin codificar realizamos la MDV en el que cogemos 100 µL y 236 de agua.
- En el tubo 3, añadimos 100 µL del tubo sin codificar.
- El control negativo es el tubo 4 el cual solamente contendrá 100 µL de agua despirogenada.
- Cuidadosamente añadimos 100 µL del reactivo LAL a los 4 tubos incluido el control negativo.
- Agitar en el Vortex e incubar a una hora a una temperatura de 37°C, observar los resultados invirtiendo los tubos a 180°.

Ensayo Unspike (sin adición de endotoxina)

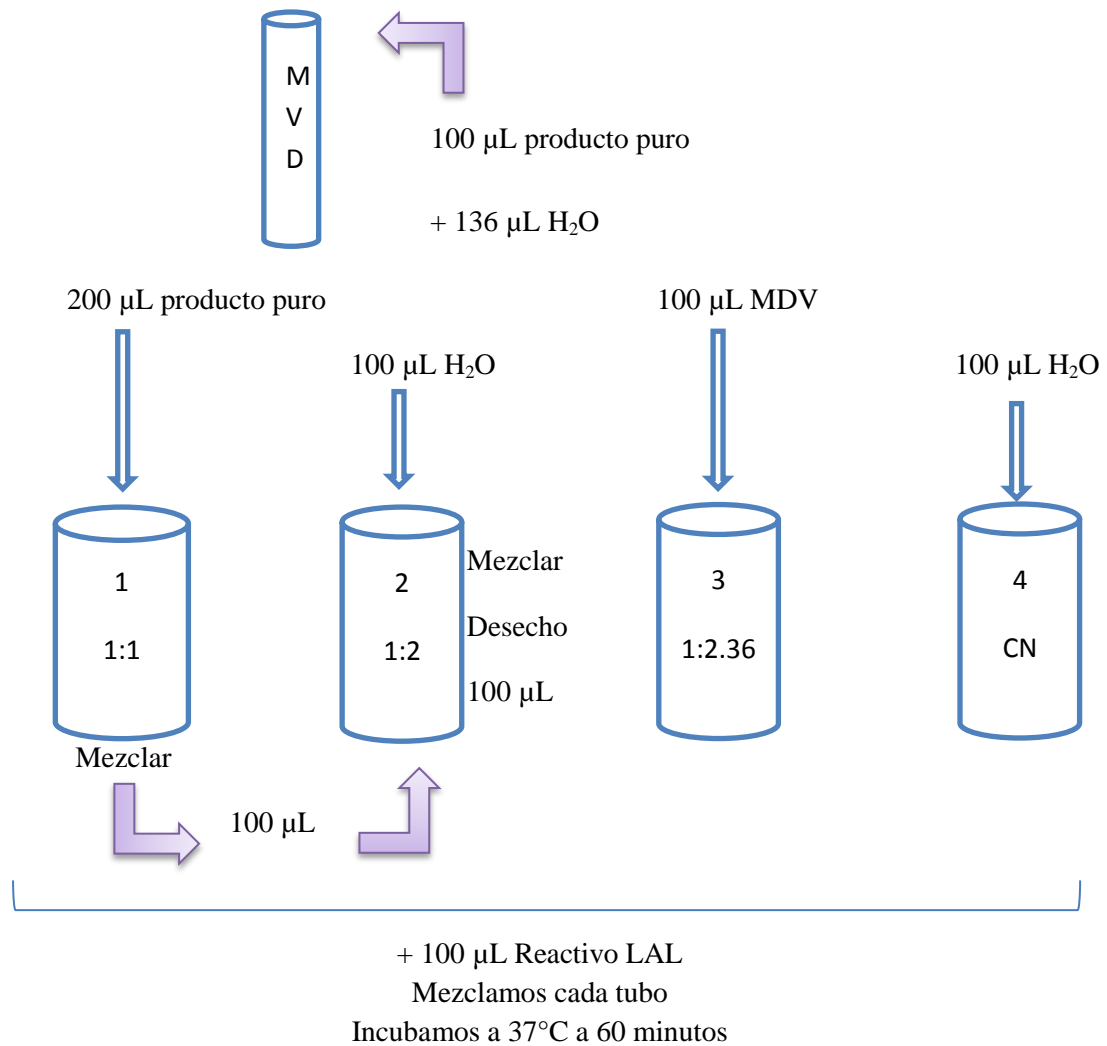


Figura N° 5-2. Ensayo Unspike (sin adición de endotoxina)

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

2.3.14 Determinación de Dilución de trabajo

Una vez realizada los ensayos preliminares Spike y Unspike se selecciona la dilución de trabajo de acuerdo a los resultados obtenidos, es decir se selecciona la que haya formado un coagulo firme, siendo esta mínimo 2 veces mayor que la dilución inicial, este valor se determina con el fin de poder usar el valor en ensayos rutinarios, de acuerdo con el máximo dilución valida del producto farmacéutico.

2.3.15 Validación del ensayo rutinario

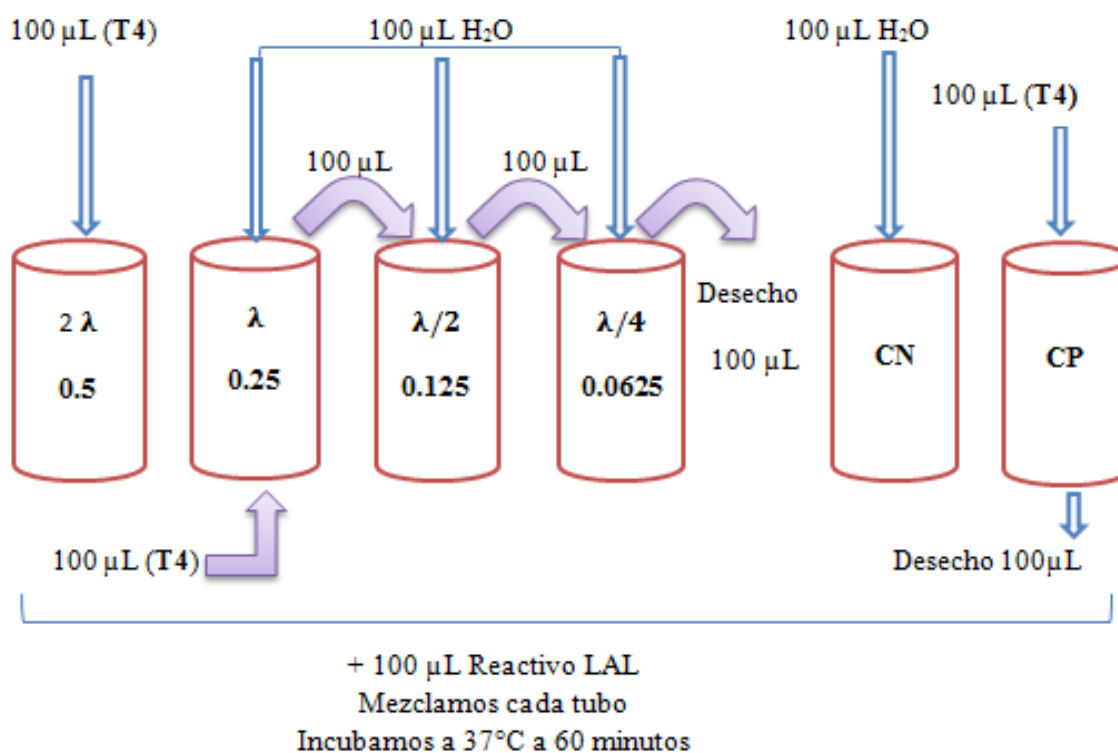


Figura N° 6-2. Validación del ensayo rutinario

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

2.3.16 Ensayo rutinario

Ensayo rutinario

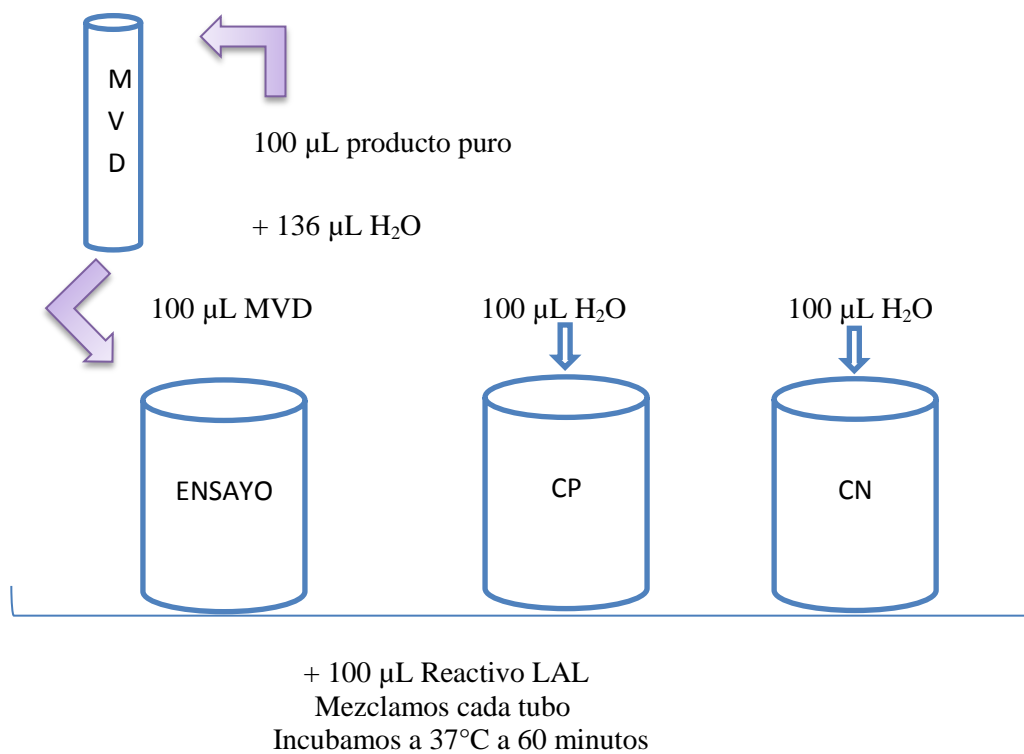


Figura N° 7-2. Ensayo rutinario

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

2.3.17 Tratamiento estadístico de resultados

Los datos fueron influenciados directamente con la observación final (punto final), se llama punto final a los últimos tubos de la serie de réplicas que dan positivo en la prueba de endotoxinas bacterianas por el método LAL, se calculó el logaritmo de cada uno y se realizó la sumatoria \sum y promedio \bar{X} . Con el valor del promedio se calcula la media geométrica (MG) con la siguiente formula:

$$MG = \text{antilog } \bar{X}$$

La desviación estándar se calculó con los datos obtenidos al calcularse el logaritmo del punto final donde:

n= número de datos

X= logaritmos de punto final

$$\lambda n - 1 \sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}{n - 1}}$$

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Resultados preliminares

Para los bulk de los tres lotes piloto se tomó el pH de la soluciones estériles de Dextrosa al 5% en Solución Salina 0.9 % registrando los siguientes datos, 6.6, 6.9, 7.1, respectivamente. Los datos muestran que los valores de pH están dentro del rango permitido según la USP 35 que es de 6.0 – 8.0, por lo tanto no fue necesario usar las soluciones NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N o soluciones reguladoras estériles para ajustar el pH.

3.2 Calificación del operario

Se calificó al operario obteniéndose los siguientes resultados descritos en la Tabla N° 1-3 y Tabla N° 2-3.

Tabla N° 1-3: Resultados de calificación del operario

REPLICA	0.5 UE/mL (2 λ)	0.25 UE/mL (1 λ)	0.125 UE/mL (0.5 λ)	0.0625 UE/mL (0.25 λ)	Control negativo	Punto final (UE/mL)
1	+	+	-	-	-	0.25
2	+	-	-	-	-	0.50
3	+	+	-	-	-	0.25
4	+	+	-	-	-	0.25
Límite de sensibilidad		0.125 – 0.50 UE/mL				
Desviación Estándar		< 0.365				

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

Tabla N° 2-3: Media geométrica y desviación estándar calificación del operario

Réplica	Punto final (UE/mL)	Log punto final
1	0.25	-0,60
2	0.50	-0.30
3	0.25	-0,60
4	0.25	-0,60
\sum punto final		-2.11
\bar{x}		-0.53
MG (Anti log de la \sum punto final/ N° de réplicas)		0.30
Desviación estándar		0.15

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

La media geométrica que obtuvimos en la calificación del operario es igual a 0.30 UE/mL, resultado que se encuentra dentro de los límites de sensibilidad 0.125 – 0.50 UE/mL y una desviación estándar igual a 0.15 estando dentro de lo especificado el cual es < 0.365, límites que son referenciados en la USP 35. Por lo tanto el operador cumple con los parámetros establecidos para realizar la determinación de endotoxinas.

3.3 Confirmación de sensibilidad del rótulo

Se confirmó la sensibilidad del rótulo obteniéndose los siguientes resultados descritos en la Tabla N° 3-3 y Tabla N° 4-3.

Tabla N° 3-3: Resultados Sensibilidad del rótulo

REPLICA	0.5 UE/mL (2 λ)	0.25 UE/mL (1 λ)	0.125 UE/mL (0.5 λ)	0.0625 UE/mL (0.25 λ)	Control negativo	Punto final (UE/mL)
1	+	+	-	-	-	0.25
2	+	+	-	-	-	0.25
3	+	+	-	-	-	0.25
4	+	+	+	-	-	0.125
Límite de sensibilidad		0.125 – 0.50 UE/mL				
Desviación Estándar		< 0.365				

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

Tabla N° 4-3: Media geométrica y desviación estándar: sensibilidad del rótulo

Réplica	Punto final (UE/mL)	Log punto final
1	0.25	-0,60
2	0.25	-0,60
3	0.25	-0,60
4	0.125	-0,90
\sum punto final		-2,71
\bar{x}		-0,68
MG (Anti log de la \sum punto final/ N° de réplicas)		0.21
Desviación estándar		0.15

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

La media geométrica que obtuvimos en la confirmación de la sensibilidad del rótulo es igual a 0.21 UE/mL, resultado que se encuentra dentro de los límites de sensibilidad 0.125 – 0.50 UE/mL y una desviación estándar igual a 0.15 estando dentro de lo especificado el cual es < 0.365 que son referenciados en la USP 35. Por lo tanto los resultados están dentro de especificación.

3.4 Cálculo de la Máxima Dilución Valida (MDV)

Se calculó la MDV para la solución inyectable Dextrosa al 5% en Solución Salina al 0.9% obteniendo un valor igual a 2.36.

$$\text{MVD} = \frac{(\text{Limite de endotoxina})(\text{Concentración de la muestra})}{(\text{Sensibilidad del rotulo})}$$

Dónde:

Límite de endotoxina = 10 UE/g

Concentración de la muestra = 29.5 g/ 500mL

Sensibilidad del rótulo = 0.25 UE/mL

$$\text{MVD} = \frac{(10 \text{ UE/g})(\frac{29.5 \text{ g}}{500 \text{ mL}})}{(0.25 \text{ UE/mL})}$$

$$\text{MVD} = 2.36$$

Para el cálculo se requiere el límite de endotoxinas que fue consultado en la USP 35 para el producto farmacéutico siendo este igual a 10 UE/g, la concentración de la muestra que es la relación entre el principio(s) activo(s) y el volumen de la forma farmacéutica resulto igual a 29.5 g/ 500 mL, y la sensibilidad del rotulo a usar en la validación fue igual a 0.25 UE/g.

Estos parámetros cambian para cada producto farmacéutico, sea por los reactivos que se usen en el laboratorio, la concentración que presente la muestra al momento de ser analizado y el límite de endotoxina que esta propuesto para cada medicamento en las farmacopeas oficiales.

3.5 Ensayos preliminares Spike y Unspike

Los resultados se muestran en las Tabla N° 5-3 y Tabla N° 6-3 respectivamente.

3.5.1 Resultados ensayo Spike (con adición de endotoxina)

Tabla N° 5-3: Resultados ensayo Spike (con adición de endotoxina)

REPLICA	Dilución 1:1 4.2 UE/MI	Dilución 1:2 8.5 UE/mL	Dilución 1:2,36 10 UE/mL	Control negativo
1	+	+	+	-
2	+	+	+	-

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

3.5.2 Resultado ensayo Unspike (sin adición de endotoxina)

Tabla N° 6-3: Ensayo Unspike (sin adición de endotoxina)

REPLICA	Dilución 1:1 4.2 UE/mL	Dilución 1:2 8.5 UE/mL	Dilución 1:2,36 10 UE/mL	Control negativo
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

La concentración de la dilución es la relación entre el producto del número de dilución por la sensibilidad del reactivo dividido para la relación entre la concentración del producto farmacéutico y el volumen que presenta la solución estéril.

$$\text{DILUCIÓN DE TRABAJO} = \frac{(\text{Limite de endotoxina})(\text{Sensibilidad del rotulo})}{(\text{Concentración de la muestra})}$$

$$\text{DILUCIÓN DE TRABAJO} = \frac{(1)(0.25 \text{ UE/mL})}{\left(\frac{29.5 \text{ g}}{500 \text{ mL}}\right)}$$

Sabiendo esto observamos que al realizar los ensayos Spike y Unspike para el producto farmacéutico no se observa interferencia alguna, por lo tanto los datos que permitirán determinar la dilución de trabajo para los ensayos rutinarios del ensayo serán confiables para validar la determinación.

3.6 Determinación de la dilución de trabajo

La dilución de trabajo después de haber realizado los ensayos preliminares Spike (con adición de endotoxina) y Unspike (sin adición de endotoxina) da como resultado 1:2,36, el mismo que servirá para los análisis rutinarios del producto para su liberación en línea.

Para encontrar la dilución de trabajo es necesario realizar los llamados ensayos preliminares para hacer posible la determinación en cuestión, siempre se escogerá la que haya formado un coagulo firme, siendo esta mínimo 2 veces mayor que la dilución inicial, este valor está relacionado directamente con la máxima dilución valida del producto farmacéutico.

3.7 Determinación de endotoxinas en la solución estéril Dextrosa al 5% en Solución Salina 0.9% en los sublotos

A continuación se detallan los resultados obtenidos para la determinación de endotoxinas bacterianas para cada bulk de cada lote analizado.

3.7.1 Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas LOTE DEX001

Tabla N° 7-3: Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas: LOTE: DEX001

REPLICA	0.5 UE/mL (2 λ)	0.25 UE/mL (1 λ)	0.125 UE/mL (0.5 λ)	0.0625 UE/mL (0.25 λ)	Control negativo	Punto final (UE/mL)
1	+	-	-	-	-	0.50
2	+	+	-	-	-	0.25
3	+	+	-	-	-	0.25
4	+	-	-	-	-	0.50
Límite de sensibilidad		0.125 – 0.50 UE/mL				
Desviación Estándar		< 0.365				

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

Tabla N° 8-3: Media geométrica y desviación estándar: LOTE: DEX001

Réplica	Punto final (UE/mL)	Log punto final
1	0.50	-0,30
2	0.25	-0,60
3	0.25	-0,60
4	0.50	-0,30
\sum punto final		-1.81
\bar{x}		-0,45
MG (Anti log de la \sum punto final/ N° de réplicas)		0.35
Desviación estándar		0.18

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

Los resultados obtenidos en la determinación de endotoxinas bacterianas en el Lote DEX001 tuvo como media geométrica un valor de 0.35 y una desviación estándar igual a 0.18, estos valores están dentro de los parámetros establecidos por la USP 35: límite de sensibilidad igual a 0.125 – 0.50 UE/mL y desviación estándar < 0.365 por lo tanto la prueba para el lote DEX001 queda validada.

3.7.2 Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas LOTE DEX002

Tabla N° 9-3: Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas: LOTE: DEX002

REPLICA	0.5 UE/mL (2 λ)	0.25 UE/mL (1 λ)	0.125 UE/mL (0.5 λ)	0.0625 UE/mL (0.25 λ)	Control negativo	Punto final (UE/mL)
1	+	+	-	-	-	0.25
2	+	-	-	-	-	0.50
3	+	-	-	-	-	0.50
4	+	+	-	-	-	0.25
Límite de sensibilidad		0.125 – 0.50 UE/mL				
Desviación Estándar		< 0.365				

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

Tabla N° 10-3: Media geométrica y desviación estándar: LOTE: DEX002

Réplica	Punto final (UE/mL)	Log punto final
1	0.25	-0,60
2	0.50	-0,30
3	0.50	-0,30
4	0.25	-0,60
\sum punto final		-1,81
\bar{x}		-0,45
MG (Anti log de la \sum punto final/ N° de réplicas)		0.35
Desviación estándar		0.18

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

Los resultados obtenidos en la determinación de endotoxinas bacterianas en el Lote DEX002 tuvo como media geométrica un valor de 0.35 y una desviación estándar igual a 0.18, estos valores están dentro de los parámetros establecidos por la USP 35: límite de sensibilidad igual a 0.125 – 0.50 UE/mL y desviación estándar < 0.365 por lo tanto la prueba para el lote DEX002 queda validada.

3.7.3 Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas LOTE DEX003

Tabla N° 11-3: Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas: LOTE: DEX003

REPLICA	0.5 UE/mL (2 λ)	0.25 UE/mL (1 λ)	0.125 UE/mL (0.5 λ)	0.0625 UE/mL (0.25 λ)	Control negativo	Punto final (UE/mL)
1	+	+	-	-	-	0.25
2	+	+	-	-	-	0.25
3	+	-	-	-	-	0.50
4	+	-	-	-	-	0.50
Límite de sensibilidad		0.125 – 0.50 UE/mL				
Desviación Estándar		< 0.365				

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

Tabla N° 12-3: Media geométrica y desviación estándar: LOTE: DEX003

Réplica	Punto final (UE/mL)	Log punto final
1	0.25	-0,60
2	0.25	-0,60
3	0.50	-0,30
4	0.50	-0,30
\sum punto final		-1.80
\bar{x}		-0,45
MG (Anti log de la \sum punto final/ N° de réplicas)		0.35
Desviación estándar		0.18

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

Los resultados obtenidos en la determinación de endotoxinas bacterianas en el Lote DEX003 tuvo como media geométrica un valor de 0.35 y una desviación estándar igual a 0.18, estos valores están dentro de los parámetros establecidos por la USP 35: límite de sensibilidad igual a 0.125 – 0.50 UE/mL y desviación estándar < 0.365 por lo tanto la prueba para el lote DEX003 queda validada.

3.8 Prueba de rutina para la Dextrosa al 5% en Solución Salina 0.9%

3.8.1 Resultados de la prueba de rutina

Tabla N° 13-3: Resultados de la prueba de rutina LOTE: DEX001

REPLICA	1:2.36	Control positivo	Control negativo
1	-	+	-
2	-	+	-

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

3.8.2 Resultados de la prueba de rutina

Tabla N° 14-3: Resultados de la prueba de rutina LOTE: DEX002

REPLICA	1:2.36	Control positivo	Control negativo
1	-	+	-
2	-	+	-

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

3.8.3 Resultados de la prueba de rutina

Tabla N° 15-3: Resultados de la prueba de rutina LOTE: DEX003

REPLICA	1:2.36	Control positivo	Control negativo
1	-	+	-
2	-	+	-

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015.

Las muestras se realizaron con la dilución de trabajo 1:2.36 y los resultados obtenidos en la prueba de rutina demuestran que no hay presencia de endotoxinas bacterianas en los lotes en estudio (Tabla N° 13-3; Tabla N° 14-3; Tabla N° 15-3) los controles dieron positivo y negativo respectivamente. Por lo que los lotes cumplen con el límite de endotoxinas dados por la USP 35.

CONCLUSIONES

- Se validó la determinación de endotoxinas bacterianas en la solución estéril Dextrosa al 5% en Solución Salina al 0.9% de la Empresa Ginsberg Ecuador S.A, quedando así documentado el protocolo para el análisis rutinario de los próximos lotes de fabricación y liberación en línea del producto.
- Se comprobó que por el método LAL se pueden determinar endotoxinas bacterianas en la solución inyectable Dextrosa al 5% en Solución Salina al 0.9%, siguiendo la metodología de las farmacopeas oficiales en este caso usamos la USP 35 como referencia.
- Se calculó el valor de Máxima Dilución Valida para la solución inyectable “Dextrosa al 5% en Solución Salina al 0.9% obteniendo un valor igual a 2.36, para el cálculo se requiere el límite de endotoxinas que fue consultado en la USP 35 para el producto farmacéutico siendo este igual a 10 UE/g, la concentración de la muestra que es la relación entre el principio(s) activo(s) y el volumen de la forma farmacéutica siendo igual a 29.5 g/ 500 mL, y la sensibilidad del rotulo a usar en la validación que fue igual a 0.25 UE/g.
- Se confirmó la sensibilidad del rótulo del reactivo LAL 0.25 UE/mL y se calificó al operario, obteniéndose resultados de sensibilidad igual a 0.21 y 0.30 respectivamente los mismo que están dentro de los límites de sensibilidad 0.125 – 0.5 UE/mL y desviación estándar igual a 0.15 para ambos casos que de igual forma está dentro de especificación < 0.365, limites dados por la USP 35.
- Se realizó los ensayos preliminares SPIKE (con adición de endotoxina) y UNSPIKE (sin adición de endotoxina) para obtener la dilución de trabajo de la solución inyectable en los que no se detectó interferencia alguna en el producto farmacéutico obteniéndose el siguiente resultado igual a 1: 2.36, no se considera el valor de pH de la solución estéril para los ensayos preliminares debido a que los bulk de cada lote dieron como resultado 6.6, 6.9, 7.1 respectivamente estando dentro del parámetro de especificación que está en un valor entre 6.0 – 8.0.

- Se calculó la media geométrica de los lotes obteniéndose un resultado de 0.35 y una desviación estándar de 0.18 del ensayo rutinario, datos que están dentro de los límites de especificación permitida por la USP 35, por lo tanto el método permite identificar eficazmente endotoxinas bacterianas en la solución dextrosa al 5% en solución salina al 0.9%.

RECOMENDACIONES

- Realizar el procedimiento del método LAL con todo el material despirogenado para que no se obtengan falsos positivos y optimizar el tiempo en cada análisis.
- Cada vez que se realice la apertura de un nuevo lote del reactivo se deberá realizar la confirmación de la sensibilidad del rótulo.
- Realizar la calificación del operario cada vez que el analista de control de calidad valide el método a usar en el laboratorio.
- Realizar la revalidación de la determinación de endotoxinas cada 6 meses para obtener resultados confiables.

GLOSARIO

BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
SGC	Sistema de Gestión de la Calidad
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
ARCSA	Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
LAL	<i>Limulus</i> amebocyte lysate
mo	Microorganismos
MVD	Máxima Dilución Valida
UE	Unidad de Endotoxina
CSE	Control Estándar de Endotoxina
GM	Media Geométrica
LWR	Agua reactivo LAL
POE	Procedimiento Operativo Estándar
UPC	Unidades Propagadoras de Colonias
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
λ	Lambda
LPS	Liposacaridos
NT	National Formulary

BIBLIOGRAFÍA

1. **BURGUET, Nancy; BRITO, Lázaro César.** “Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica”. *Vaccimonitor*, vol. 21, n° 3 (2012), pp. 32-36.
2. **BURGUET LAGO, Nancy; REYES TUR, María Isabel; BRITO GODOY, Lázaro C y TROCHE CONCEPCION, Yenilen.** “Valoración de endotoxinas bacterianas en el inyectable ácido zoledrónico mediante la prueba de lisado del amebocito de Limulus”. *Revista Cubana de Farmacia*, vol.46, n°3 (2012), pp. 320-328.
3. **BURGUET LAGO, Nancy; SUÁREZ CASTILLO, Aylid; HERRERA LEDESMA, Yamilka.** “Evaluación del método cromogénico cinético para la determinación de endotoxinas bacterianas en el inyectable succinilcolina infantil 100 mg”. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, vol. 46, n° 3 (2015), p. 251-258.
4. **CARRILLO, C., OSPINA, J., ALDANA, D., ARIAS, J., ECHEVERRI, C..** “Valoración de endotoxinas bacterianas en ranitidina y penicilina G sódica inyectable mediante la prueba de Lisado del Amebocito de Limulus”, *Universitas Scientiarum*, vol 11, n°1 (2006), pp. 15-28.
5. **CARMINE, C; MARLYS, E.** “Limulus amebocyte lysate(LAL) test for detecting pyrogens in parenteral injectable products and medical devices: advantages to manufacturers and regulatory officials”. *Journal of the Parenteral Drug Association*, vol 1, n° 6(1979), pp. 81-95.

6. **COOPER, J.F.** “Metodología para la validación de prueba de Limulus para producto terminado”. *Pharmecutical Technology*, vol 4, n° 6(1980), pp. 72-79.
7. **CORTES, NATALIA CARO; MÉNDEZ, YEHIMY CRUZ.** *Validación de las pruebas de esterilidad por la técnica de filtración por membrana y endotoxinas bacterianas por el método de LAL en 3 productos farmacéuticos.* (tesis). (doctoral). Pontificia Universidad javeriana, Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá DC Colombia. 2006, pp. 4-5.
8. **GENNARO, Alfonso.** *Remington Farmacia.* México: Medica Panamericana, 2003, p.639
9. **GINSBERG ECUADOR S.A.,** *Información de productos* (2015), p.158
10. **GINSBERG ECUADOR S.A.,** *Prospectos productos* (2015), p.158
11. **GINSBERG ECUADOR S.A.,** *Aseguramiento de la calidad* (2014), p.100
12. **GINSBERG ECUADOR S.A.,** *Política de calidad* (2014), p.10
13. **GONZALES, Lisa Marie.** *Endotoxinas y su importancia en la salud pública* [en línea], 2014. [Consulta: 28 noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.tecnologosmedicos.org/home/images/pdf/lectura-endotoxinas-su-importancia-sal.pdf>

14. **GONZALES, Agustín; GUTIERREZ, Enrique.** *Validación de la prueba del lisado de amebocito del Limulus (LAL) para la detección de Endotoxinas Bacteriana en soluciones parenterales.* (tesis). (pregrado). Universidad de Guadalajara. México, 1994, pp. 1-6.
15. **IDRAYANTO, Gunawan.** "Excipients and Related Methodology". *Profiles of drug sustances*, vol 37 (2012), pp. 439-465.
16. **MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA CUBA.** *Validacion de Métodos Analíticos.* [En línea] 2013. [Citado el: 23 de Septiembre de 2015.] Disponible en: http://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/validacion_de_metodos_analiticos.pdf#overlay-context=reglamentacion/aprobadas%3Fpage%3D1.
17. **MOROTE, Maria; OTERO, M.; CHÁVEZ, G.** "Validación de la Técnica L.A.L. (GEL CLOT) en los Agentes de Radiodiagnóstico y Radioisótopos". *Alasbimn Journal*, vol 4 n° 16 (2002), pp.30-35
18. **OSORIO ROJAS, Olga, et al.** "Interferencias en la validación del ensayo de lisado de amebocitos de Limulus para oxitetraciclina 50 mg/mL". *Revista Cubana de Farmacia*, vol. 41, n° 1 (2007).
19. **OSORIO, Claudia.** *Validación de la prueba de Endotoxinas Bacterianas LAL (Limulus Amebocyte Lysate) por el método de gel clot en el producto furosemida 20 mg inyectable.* (tesis). (doctoral). Universidad Nacional El Salvador. El Salvador, 2011, pp. 51.
20. **PERDOMO MORALES, Rolando.** Ensayo del lisado de amebocitos del Limulus (LAL). *Revista Cubana Farmacia*, vol.38, n° 1 (2004), pp. 8-15.

21. **REYES, Rodrigo.** "Validación de procesos como herramientas de mejora continua". *Revista Validaciones Buenos Aires*, vol 2 n°23 (2001), pp. 26-28
22. **SALAS, M.** "Validación de la Prueba de Endotoxinas bacterianas por la técnica de Limulus amebocyte lysate LAL Método de gel Clot." *Curso teórico Práctico: HYPATIA SA* Lima (2001).
23. **SALAZAR, Luis.** *Validación de métodos analíticos* [en línea], 2004. [Consulta: 28 noviembre 2015]. Disponible en: http://www.med.ufro.cl/Recursos/Bioquimica-offline/Apuntes/clinica1/validacion_metodologica_imp.pdf.
24. **SOLÍS ASENCIOS, Jenny Susan; MIRTHA ROQUE Alcarraz.** *Validación de la prueba de Endotoxinas Bacterianas LAL (Limulus Amebocyte Lysate) por el método de gel clot en Clindamicina 600 Mg. Inyectable.* (tesis). (pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Programa Cybertesis Perú, 2004.
25. **USP 21 NF-15.** *Capítulo 85. Bacterial Endotoxins Test.*
26. **USP 31 NF-26.** *Capítulo 1225. Validation of Compendial Procedures.*
27. **USP 35 NF-30.** *Capítulo 85. Bacterial Endotoxins Test.*
28. **USP 35 NF-30.** *Capítulo 1225. Validation of Compendial Procedures.*

ANEXOS

Anexo A: Registro Sanitario Dextrosa al 5% en Solución Salina 0.9%

Ministerio de Salud Pública	
Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria - ARCSA	
REPÚBLICA DEL ECUADOR	
N° 0003728	
Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria - ARCSA	
CERTIFICADO DE REGISTRO SANITARIO No. GBN2750913 INSCRIPCION DE MEDICAMENTO GENERICO BASICO NACIONAL	
Producto denominado:	Dextrosa al 5% en Solución salina al 0,9%
Elaborado por:	GINSBERG ECUADOR S.A., QUITO - ECUADOR
Origen del fabricante:	ECUADOR
Dirección del Fabricante:	ANTONIO CASTILLO N77 Y JUAN BARREZUETA
Titular:	LIMERICKPHARMA CIA. LTDA., QUITO - ECUADOR
A solicitud de:	LIMERICKPHARMA CIA. LTDA., QUITO - ECUADOR
Forma farmacéutica:	SOLUCION INYECTABLE
Descripción de la forma farmacéutica:	Líquido transparente incoloro, libre de partículas.
Envase:	Interno: Funda plástica (PVC) transparente para sueros Tipo VI USP x 500 ml provisto de un pistón de policarbonato transparente, contenida en una sobrefunda plástica (Polietileno de alta densidad) traslúcida debidamente sellada. Externo: N/A
Presentación Comercial:	Funda x 100 ml de solución inyectable + Inserto. Funda x 250 ml de solución inyectable + Inserto. Funda x 500 ml de solución inyectable + Inserto. Funda x 1000 ml de solución inyectable + Inserto. Funda x 100 ml de solución inyectable (Muestra Médica). Funda x 250 ml de solución inyectable (Muestra Médica). Funda x 500 ml de solución inyectable (Muestra Médica). Funda x 1000 ml de solución inyectable (Muestra Médica). Funda x 100 ml de solución inyectable + Inserto (Presentación Hospitalaria). Funda x 250 ml de solución inyectable + Inserto (Presentación Hospitalaria). Funda x 500 ml de solución inyectable + Inserto (Presentación Hospitalaria). Funda x 1000 ml de solución inyectable + Inserto (Presentación Hospitalaria).
Fórmula de Composición:	
Cada 100 ml de solución inyectable contiene	
Principio Activo:	
D-Glucosa.....5,0 g; Cloruro de sodio.....0,9 g.	
Excipientes:	
Agua inyectable c.s.p. 100,0 ml	
Clasificado como: GENERICO BASICO OFICIAL	Venta: BAJO RECETA MEDICA
CUM: B05BB02SLY38502	Vía de Administración: INTRAVENOSA
Período de Vida Útil: 24 meses	Solicitud: INGB-1333-01-2013
	En GUAYAQUIL: 02/09/2013
(f) Dr. Marco Dehesa González	Vigencia hasta: 02/09/2018
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA AGENCIA NACIONAL DE REGULACIÓN, CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA - ARCSA	

Anexo B: Limite de endotoxinas dextrosa al 5% en solución salina 0.9% USP 35

© 2015 USPC Official 5/1/12 - 7/31/12 USP Monographs: Dextrose and Sodium Chloride Injection Página 1 de 2

Dextrose and Sodium Chloride Injection

» Dextrose and Sodium Chloride Injection is a sterile solution of Dextrose and Sodium Chloride in Water for Injection. It contains not less than 95.0 percent and not more than 105.0 percent of the labeled amount of dextrose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) and of sodium chloride (NaCl). It contains no antimicrobial agents.

Packaging and storage— Preserve in single-dose glass or plastic containers. Glass containers are preferably of Type I or Type II glass.

Labeling— The label states the total osmolar concentration in mOsmol per L. Where the contents are less than 100 mL, or where the label states that the Injection is not for direct injection but is to be diluted before use, the label alternatively may state the total osmolar concentration in mOsmol per mL.

USP REFERENCE STANDARDS $\langle 11 \rangle$ —

USP Endotoxin RS

Identification— It responds to the *Identification* test under *Dextrose*, and to the tests for *Sodium* $\langle 191 \rangle$ and for *Chloride* $\langle 191 \rangle$.

BACTERIAL ENDOTOXINS $\langle 85 \rangle$ — It contains not more than 10.0 USP Endotoxin Units per g of dextrose.

pH $\langle 791 \rangle$: between 3.2 and 6.5, determined on a portion diluted with water, if necessary, to a concentration of not more than 5% of dextrose.

Limit of 5-hydroxymethylfurfural and related substances— Dilute an accurately measured volume of Injection, equivalent to 1.0 g of $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ with water to 500.0 mL. Determine the absorbance of this solution in a 1-cm cell at 284 nm, with a suitable spectrophotometer, using water as the blank: the absorbance is not more than 0.25.

Other requirements— It meets the requirements under *Injections* $\langle 1 \rangle$.

Assay for dextrose— Transfer an accurately measured volume of Injection, containing from 2 to 5 g of dextrose, to a 100-mL volumetric flask. Add 0.2 mL of 6 N ammonium hydroxide, dilute with water to volume, and mix. Determine the angular rotation in a suitable polarimeter tube (see *Optical Rotation* $\langle 781 \rangle$). Calculate the percentage (g per 100 mL) of dextrose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) in the portion of Injection taken by the formula:

$$(100/52.9)(198.17/180.16)AR$$

in which 100 is the percentage; 52.9 is the midpoint of the specific rotation range for anhydrous dextrose, in degrees; 198.17 and 180.16 are the molecular weights for dextrose monohydrate and anhydrous dextrose, respectively; A is 100 mm divided by the length of the polarimeter tube, in mm; and R is the observed rotation, in degrees.

Assay for sodium chloride— Transfer an accurately measured volume of Injection, equivalent to about 90 mg of sodium chloride, to a conical flask, and add 10 mL of glacial acetic acid, 75 mL of

methanol, and 3 drops of eosin Y TS. Titrate, with shaking, with 0.1 N silver nitrate VS to a pink endpoint. Each mL of 0.1 N silver nitrate is equivalent to 5.844 mg of NaCl.

Auxiliary Information— Please check for your question in the FAQs before contacting USP.

Topic/Question	Contact	Expert Committee
Monograph	<u>Domenick Vicchio, Ph.D.</u> Senior Scientific Liaison 1-301-998-6828	(SM42010) Monographs - Small Molecules 4
Reference Standards	RS Technical Services 1-301-816-8129 rstech@usp.org	
(85)	<u>Radhakrishna S Tirumalai, Ph.D.</u> Principal Scientific Liaison 1-301-816-8339	(GCM2010) General Chapters - Microbiology

USP35–NF30 Page 2863

Pharmacopeial Forum: Volume No. 30(5) Page 1614

(85) BACTERIAL ENDOTOXINS TEST

Portions of this general chapter have been harmonized with the corresponding texts of the *European Pharmacopoeia* and/or the *Japanese Pharmacopoeia*. Those portions that are not harmonized are marked with symbols () to specify this fact.

The Bacterial Endotoxins Test (BET) is a test to detect or quantify endotoxins from Gram-negative bacteria using amoebocyte lysate from the horseshoe crab (*Limulus polyphemus* or *Tachypleus tridentatus*).

There are three techniques for this test: the gel-clot technique, which is based on gel formation; the turbidimetric technique, based on the development of turbidity after cleavage of an endogenous substrate; and the chromogenic technique, based on the development of color after cleavage of a synthetic peptide-chromogen complex. Proceed by any of the three techniques for the test. In the event of doubt or dispute, the final decision is made based upon the gel-clot technique unless otherwise indicated in the monograph for the product being tested. The test is carried out in a manner that avoids endotoxin contamination.

APPARATUS

Depyrogenate all glassware and other heat-stable materials in a hot air oven using a validated process.¹ A commonly used minimum time and temperature is 30 minutes at 250°. If employing plastic apparatus, such as microplates and pipet tips for automatic pipettors, use apparatus that is shown to be free of detectable endotoxin and does not interfere in the test. [NOTE—In this chapter, the term “tube” includes any other receptacle such as a microtiter well.]

REAGENTS AND TEST SOLUTIONS

Amoebocyte Lysate— A lyophilized product obtained from the lysate of amoebocytes (white blood cells) from the horseshoe crab (*Limulus polyphemus* or *Tachypleus tridentatus*). This reagent refers only to a product manufactured in accordance with the regulations of the competent authority. [NOTE—*Amoebocyte Lysate* reacts to some β -glucans in addition to endotoxins. *Amoebocyte Lysate* preparations that do not react to glucans are available: they are prepared by removing the G factor reacting to glucans from *Amoebocyte Lysate* or by inhibiting the G factor reacting system of *Amoebocyte Lysate* and may be used for endotoxin testing in the presence of glucans.]

Water for Bacterial Endotoxins Test (BET)— Use Water for Injection or water produced by other procedures that shows no reaction with the lysate employed, at the detection limit

of the reagent.

Lysate TS— Dissolve *Amoebocyte Lysate* in *Water for BET*, or in a buffer recommended by the lysate manufacturer, by gentle stirring. Store the reconstituted lysate, refrigerated or frozen, according to the specifications of the manufacturer.

PREPARATION OF SOLUTIONS

Standard Endotoxin Stock Solution— A *Standard Endotoxin Stock Solution* is prepared from a USP Endotoxin Reference Standard that has been calibrated to the current WHO International Standard for Endotoxin. Follow the specifications in the package leaflet and on the label for preparation and storage of the *Standard Endotoxin Stock Solution*. Endotoxin is expressed in Endotoxin Units (EU). [NOTE—One USP Endotoxin Unit (EU) is equal to one International Unit (IU) of endotoxin.]

Standard Endotoxin Solutions— After mixing the *Standard Endotoxin Stock Solution* vigorously, prepare appropriate serial dilutions of *Standard Endotoxin Solution*, using *Water for BET*. Use dilutions as soon as possible to avoid loss of activity by adsorption.

Sample Solutions— Prepare the *Sample Solutions* by dissolving or diluting drugs, or taking washes from medical devices using *Water for BET*. Some substances or preparations may be more appropriately dissolved, diluted, or extracted in other aqueous solutions. If necessary, adjust the pH of the solution to be examined (or dilution thereof) so that the pH of the mixture of the lysate and *Sample Solution* falls within the pH range specified by the lysate manufacturer, usually 6.0 to 8.0. The pH may be adjusted by use of an acid, base, or suitable buffer as recommended by the lysate manufacturer. Acids and bases may be prepared from concentrates or solids with *Water for BET* in containers free of detectable endotoxin. Buffers must be validated to be free of detectable endotoxin and interfering factors.

Change to read:

DETERMINATION OF MAXIMUM VALID DILUTION (MVD)

The maximum valid dilution is the maximum allowable dilution of a specimen at which the endotoxin limit can be determined. Determine the MVD from the following equation:

$$\text{MVD} = (\text{Endotoxin Limit} \times \text{Concentration of Sample Solution}) / (\lambda)$$

Endotoxin Limit— The endotoxin limit for parenteral drugs, defined on the basis of dose, equals $K/M^{1/2}$, where K is a threshold pyrogenic dose of endotoxin per kg of body weight, and M is equal to the maximum recommended bolus dose of product per kg of body weight. When the product is to be injected at frequent intervals or infused continuously, M is the maximum total dose administered in a single hour period. The

endotoxin limit for parenteral drugs is specified in the individual monograph in units such as EU/mL, EU/mg, EU/Unit of biological activity, etc.

Concentration of Sample Solution—

mg/mL: in the case of endotoxin limit specified by weight (EU/mg);

Units/mL: in the case of endotoxin limit specified by unit of biological activity (EU/Unit);

mL/mL: when the endotoxin limit is specified by volume (EU/mL).

λ : the labeled sensitivity in the *Gel-Clot Technique* (EU/mL) or the lowest concentration used in the standard regression curve for the *Turbidimetric Technique* or *Chromogenic Technique*.

Change to read:

GEL-CLOT TECHNIQUE

The gel-clot technique is used for detecting or quantifying endotoxins based on clotting of the lysate reagent in the presence of endotoxin. The minimum concentration of endotoxin required to cause the lysate to clot under standard conditions is the labeled sensitivity of the lysate reagent. To ensure both the precision and validity of the test, perform the tests for confirming the labeled lysate sensitivity and for interfering factors as described in *Preparatory Testing*, immediately below.

Preparatory Testing

Test for Confirmation of Labeled Lysate Sensitivity— Confirm in four replicates the labeled sensitivity, λ , expressed in EU/mL of the lysate prior to use in the test. The test for confirmation of lysate sensitivity is to be carried out when a new batch of lysate is used or when there is any change in the test conditions that may affect the outcome of the test. Prepare standard solutions having at least four concentrations equivalent to 2λ , λ , 0.5λ , and 0.25λ by diluting the USP Endotoxin RS with *Water for BET*.

Mix a volume of the *Lysate TS* with an equal volume (such as 0.1-mL aliquots) of one of the *Standard Endotoxin Solutions* in each test tube. When single test vials or ampuls containing lyophilized lysate are used, add solutions directly to the vial or ampul. Incubate the reaction mixture for a constant period according to the directions of the lysate manufacturer (usually at $37 \pm 1^\circ$ for 60 ± 2 minutes), avoiding vibration. To test the integrity of the gel, take each tube in turn directly from the incubator, and invert it through about 180° in one smooth motion. If a firm gel has formed that remains in place upon inversion, record the result as positive. A result is negative if an intact gel is not formed. The test is considered valid when the lowest concentration of the standard solutions shows a negative result in all replicate tests.

The endpoint is the smallest concentration in the series of decreasing concentrations of standard endotoxin that clots the lysate. Determine the geometric mean endpoint by calculating the mean of the logarithms of the endpoint concentrations of the four

replicate series and then taking the antilogarithm of the mean value, as indicated in the following formula:

$$\text{Geometric Mean Endpoint Concentration} = \text{antilog} (\Sigma e/f)$$

where Σe is the sum of the log endpoint concentrations of the dilution series used, and f is the number of replicate test tubes. The geometric mean endpoint concentration is the measured sensitivity of the lysate (in EU/mL). If this is not less than 0.5λ and not more than 2λ , the labeled sensitivity is confirmed and is used in tests performed with this lysate.

Test for Interfering Factors— Usually prepare solutions (A–D) as shown in [Table 1](#), and perform the inhibition/enhancement test on the *Sample Solutions* at a dilution less than the MVD, not containing any detectable endotoxins, operating as described for *Test for Confirmation of Labeled Lysate Sensitivity*. The geometric mean endpoint concentrations of *Solutions B* and *C* are determined using the formula described in the *Test for Confirmation of Labeled Lysate Sensitivity*. *The test for interfering factors must be repeated when any condition changes that is likely to influence the result of the test.

©(IRA 1-Apr-2011)

Table 1. Preparation of Solutions for the Inhibition/Enhancement Test for Gel-Clot Techniques

Solution	Endotoxin Concentration/ Solution to Which Endotoxin Is Added	Diluent	Dilution Factor	Endotoxin Concentration	Number of Replicates
A ^a	None/ <i>Sample Solution</i>	—	—	—	4
B ^b	2λ / <i>Sample Solution</i>	<i>Sample Solution</i>	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0.5λ	4
			8	0.25λ	4
C ^c	2λ / <i>Water for BET</i>	<i>Water for BET</i>	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D ^d	None/ <i>Water for BET</i>	—	—	—	2
^a <i>Solution A</i> : A <i>Sample Solution</i> of the preparation under test that is free of detectable endotoxins.					
^b <i>Solution B</i> : Test for interference.					

^c	<i>Solution C</i> : Control for labeled lysate sensitivity.
^d	<i>Solution D</i> : Negative control of <i>Water for BET</i> .

The test is considered valid when all replicates of *Solutions A* and *D* show no reaction and the result of *Solution C* confirms the labeled sensitivity.

If the sensitivity of the lysate determined in the presence of *Solution B* is not less than 0.5λ and not greater than 2λ , the *Sample Solution* does not contain factors that interfere under the experimental conditions used. Otherwise, the *Sample Solution* to be examined interferes with the test.

If the sample under test does not comply with the test at a dilution less than the MVD, repeat the test using a greater dilution, not exceeding the MVD. The use of a more sensitive lysate permits a greater dilution of the sample to be examined, and this may contribute to the elimination of interference.

Interference may be overcome by suitable treatment such as filtration, neutralization, dialysis, or heating. To establish that the chosen treatment effectively eliminates interference without loss of endotoxins, perform the assay described above using the preparation to be examined to which Standard Endotoxin has been added and which has then been submitted to the chosen treatment.

Limit Test

Procedure— Prepare *Solutions A*, *B*, *C*, and *D* as shown in [Table 2](#), and perform the test on these solutions following the procedure above for *Preparatory Testing*, *Test for Confirmation of Labeled Lysate Sensitivity*.

Table 2. Preparation of Solutions for the Gel-Clot Limit Test

Solution [*]	Endotoxin Concentration/ Solution to Which Endotoxin Is Added	Number of Replicates
A	None/Diluted <i>Sample Solution</i>	2
B	2λ /Diluted <i>Sample Solution</i>	2
C	2λ / <i>Water for BET</i>	2
D	None/ <i>Water for BET</i>	2

^{*} Prepare *Solution A* and the positive product control *Solution B* using a dilution not greater than the MVD and treatments as described for the *Test for Interfering Factors* in *Preparatory Testing*. The positive control *Solutions B* and *C* contain the *Standard Endotoxin Solution* at a concentration corresponding to twice the labeled lysate sensitivity. The negative control *Solution D* consists of *Water for BET*.

Interpretation— The test is considered valid when both replicates of *Solution B* and *C* are positive and those of *Solution D* are negative. When a negative result is found for both replicates of *Solution A*, the preparation under test complies with the test. When a positive

result is found for both replicates of *Solution A*, the preparation under test does not comply with the test.

When a positive result is found for one replicate of *Solution A* and a negative result is found for the other, repeat the test. In the repeat test, the preparation under test complies with the test if a negative result is found for both replicates of *Solution A*. The preparation does not comply with the test if a positive result is found for one or both replicates of *Solution A*. However, if the preparation does not comply with the test at a dilution less than the MVD, the test may be repeated using a greater dilution, not exceeding the MVD.

Quantitative Test

Procedure— The test quantifies bacterial endotoxins in *Sample Solutions* by titration to an endpoint. Prepare *Solutions A, B, C, and D* as shown in [Table 3](#), and test these solutions by following the procedure in *Preparatory Testing, Test for Confirmation of Labeled Lysate Sensitivity*.

Table 3. Preparation of Solutions for the Gel-Clot Assay

Solution	Endotoxin Concentration/ Solution to Which Endotoxin Is Added	Diluent	Dilution Factor	Endotoxin Concentration	Number of Replicates
A ^a	None/ <i>Sample Solution</i>	<i>Water for BET</i>	1	—	2
			2	—	2
			4	—	2
			8	—	2
B ^b	2λ/ <i>Sample Solution</i>	—	1	2λ	2
C ^c	2λ/ <i>Water for BET</i>	<i>Water for BET</i>	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D ^d	None/ <i>Water for BET</i>	—	—	—	2

^a *Solution A: Sample Solution* under test at the dilution, not to exceed the MVD, with which the *Test for Interfering Factors* was completed. Subsequent dilution of the *Sample Solution* must not exceed the MVD. Use *Water for BET* to make a dilution series of four tubes containing the *Sample Solution* under test at concentrations of 1, ½, ¼, and 1/8 relative to the concentration used in the *Test for Interfering Factors*. Other dilutions up to the MVD may be used as appropriate.

^b *Solution B: Solution A* containing standard endotoxin at a concentration of 2λ (positive product control).

Anexo D: Fotografías: validación en el laboratorio



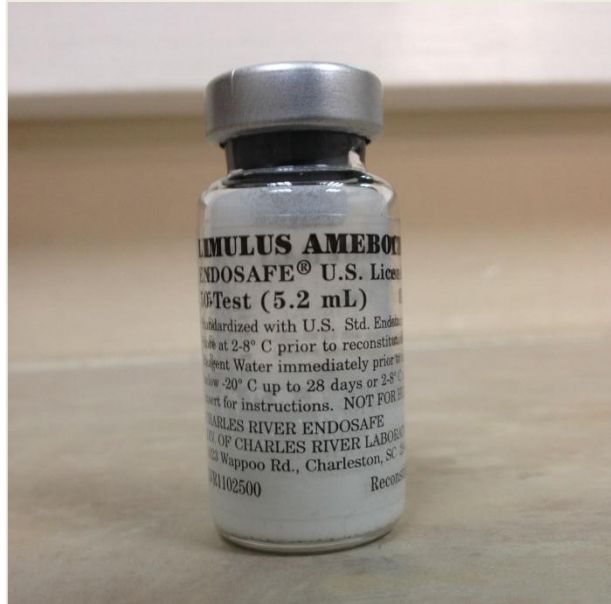
Fotografía N° 1: Kit de reactivo LAL

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



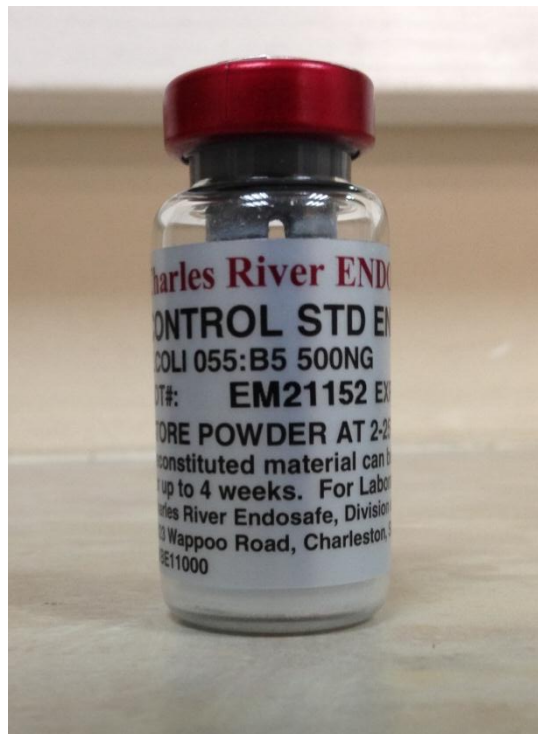
Fotografía N° 2: Agua reactivo LAL

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



Fotografía N° 3: Reactivo LAL

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



Fotografía N° 4: Control estándar de endotoxina

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



Fotografía N° 5: Material despirogenado

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



Fotografía N° 6: Gradilla

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



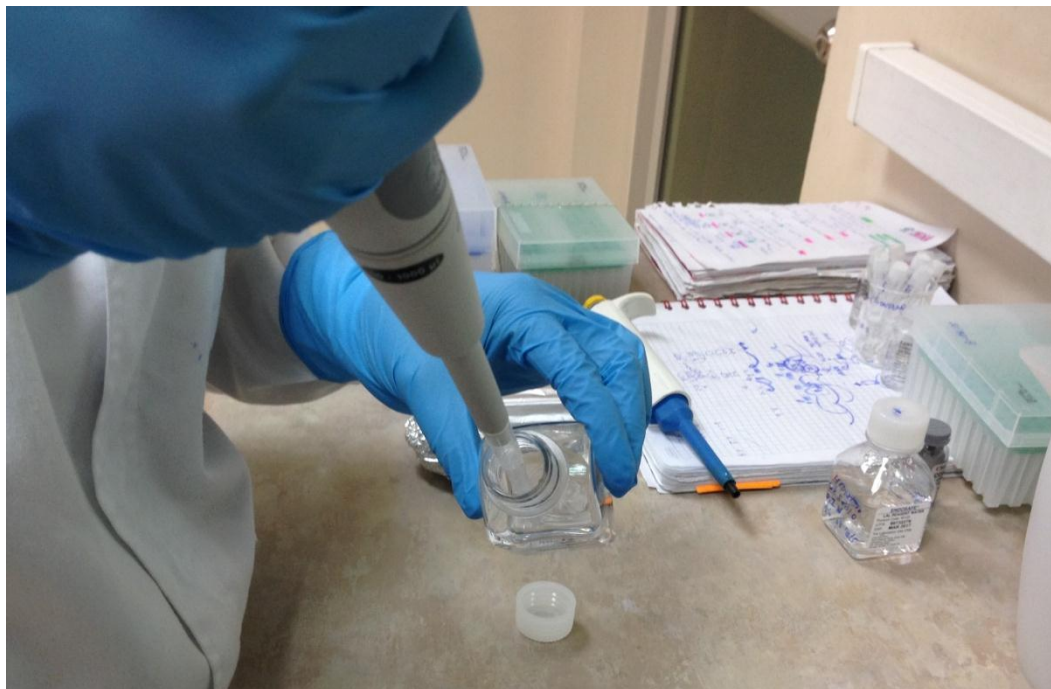
Fotografía N° 6: Baño María Selecta

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



Fotografía N° 7: Material de estudio

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



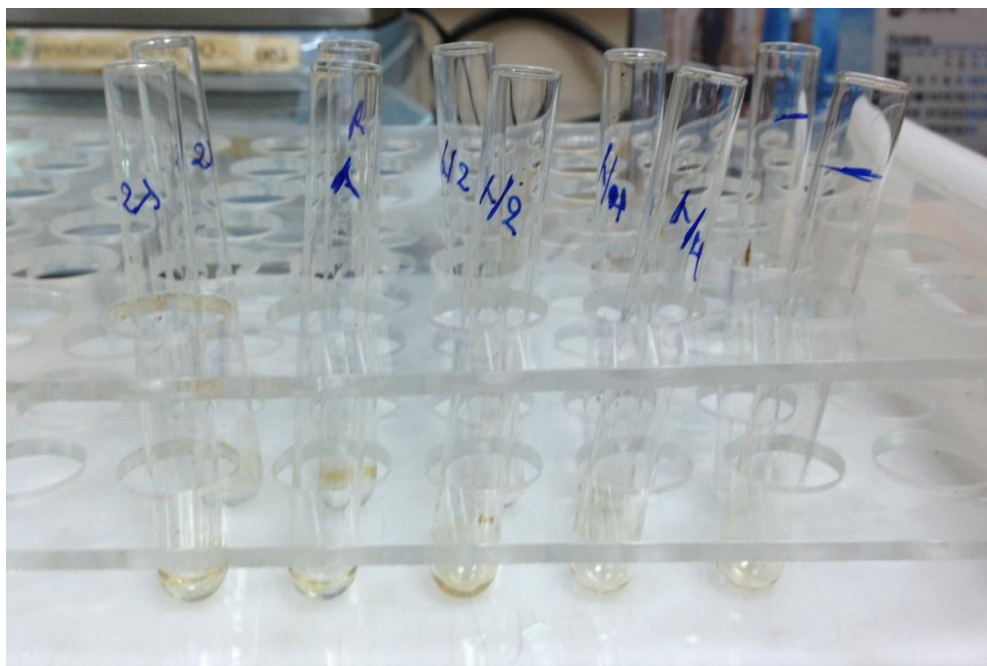
Fotografía N° 8: Preparación del Control estándar

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



Fotografía N° 9: Agitación en Vortex

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



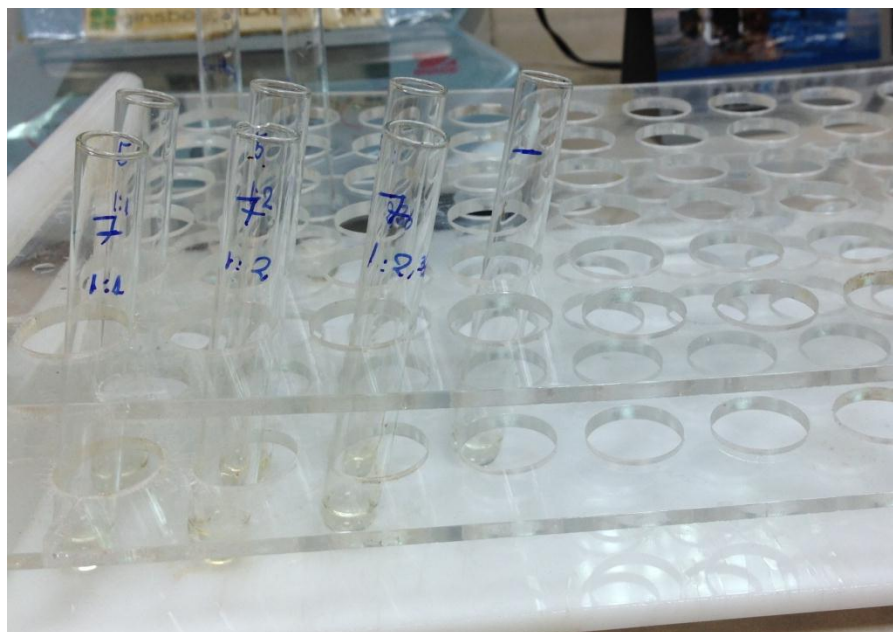
Fotografía N° 10: Curva estándar

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



Fotografía N° 11: Incubación de muestras a 37°

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



Fotografía N° 12: Ensayos prelimiaries

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



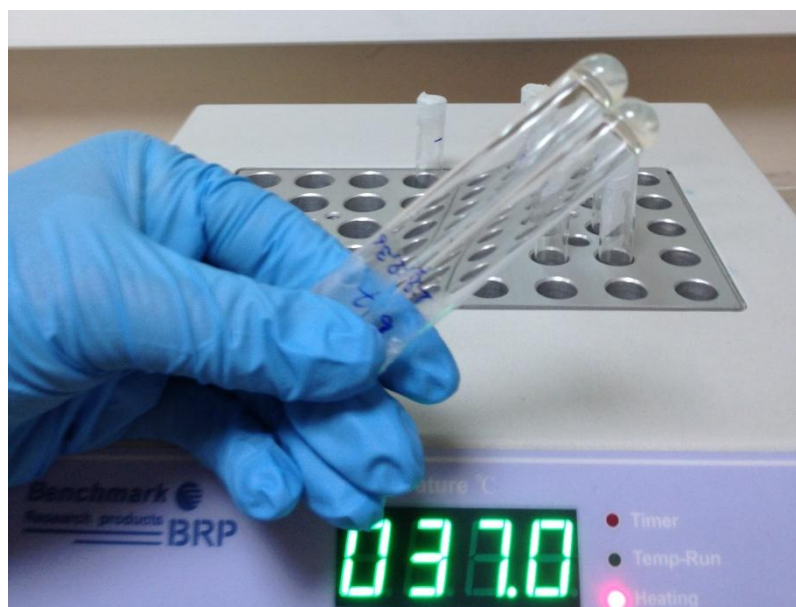
Fotografía N° 13: Ensayo de Rutina

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



Fotografía N° 14: Lectura de resultados

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015



Fotografía N° 15: Lectura de resultados

Realizado por: Leonardo Núñez, 2015